

Tratamento de águas ruças por fitorremediação com *Lemna minor* ou por biossorção com cortiça

Liliana Isabel Pinto Oliveira

Mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade da Água

Departamento de Biologia

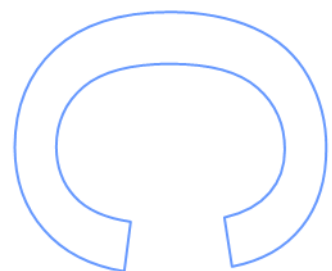
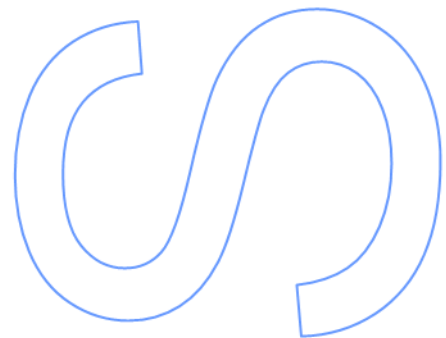
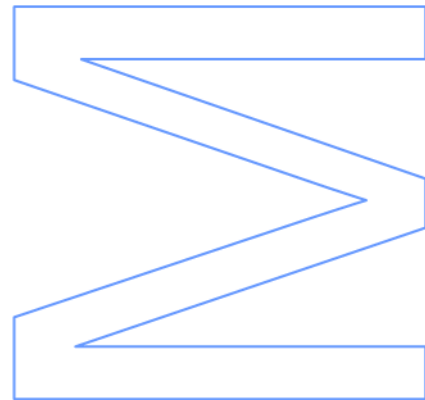
2013

Orientador

Ruth Maria Oliveira Pereira, Professor Auxiliar Convidado do Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Coorientador

Maria Teresa Martins Borges, Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

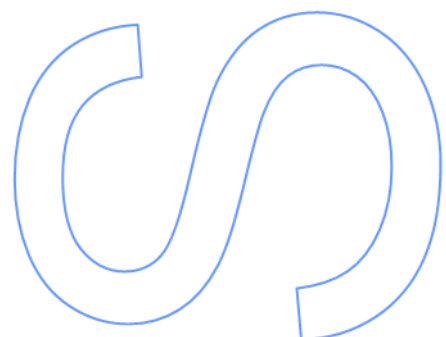
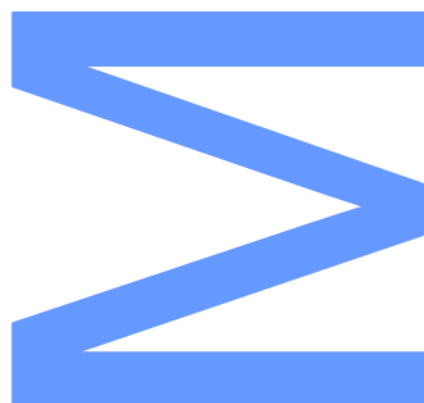




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



AGRADECIMENTOS

O trabalho apresentado resultou do apoio de diversas pessoas e desta forma queria agradecer as que tiveram um papel importante na sua realização.

À minha orientadora Professora Ruth Pereira agradeço a amizade, o apoio, orientação, disponibilidade e sugestões que contribuíram para a concretização deste trabalho.

O meu agradecimento à Professora Doutora Natividade Vieira pela disponibilidade e apoio demonstrado sempre que solicitado.

À minha coorientadora Professora Maria Teresa Borges o meu agradecimento pelas sugestões, críticas e conselhos.

Agradeço ao Professor Paulo Santos a disponibilidade na utilização da lupa binocular (Leica MZ 75) e o software de fotografia de imagem também da Leica.

À Corticeira Amorim pela informação dispensada e disponibilidade no fornecimento do material utilizado nos ensaios.

Ao Sr. Fernando Lima pela disponibilidade no fornecimento de águas ruças utilizadas no ensaio, bem como a informação fornecida sobre o modo de operação do lagar de azeite.

Ao Eng.^o Rui Boaventura pela informação dispensada necessária à elaboração deste trabalho.

À Professora Teresa Rocha Santos do Instituto Piaget de Viseu pela execução das análises químicas.

Agradeço especialmente à minha amiga e colega de trabalho Margarida pela amizade, apoio constante e conselhos que muito me ajudaram ao longo do ano de trabalho.

Aos meus Pais agradeço especialmente o apoio prestado ao longo destes dois anos.

Por fim, um agradecimento especial ao meu companheiro Hugo pelo apoio incondicional, ajuda e paciência demonstradas.

“ Não existem métodos fáceis para resolver problemas difíceis”

René Descartes

RESUMO

A indústria de produção de azeite é uma atividade económica importante nos países mediterrânicos, produzindo uma grande quantidade de efluente residual designado de águas ruças, que representa um sério problema ambiental. A composição química das águas ruças é muito variável e depende de diversos fatores, mas no geral a sua composição principal caracteriza-se por uma elevada carga orgânica, pH ácido, cheiro intenso e cor castanha muito escura. A elevada complexidade orgânica dos seus constituintes, contribuem para a sua resistência à biodegradação, causando efeitos ambientais negativos. Não existe ainda um método de tratamento globalmente aceite para este resíduo devido principalmente às limitações técnicas e económicas.

O presente trabalho procurou encontrar respostas para este problema de contaminação ambiental, recorrendo a técnicas de fitorremediação e bioissorção. Para isso foi dividido em dois objetivos distintos: em primeiro lugar procedeu-se a um ensaio de fitorremediação para avaliar o potencial da espécie *Lemna minor* para melhorar as propriedades físicas e químicas das águas ruças; e por último procedeu-se a um ensaio de bioissorção com dois tipos de granulados de cortiça para avaliar o uso potencial deste material adsorvente no tratamento de águas ruças.

O ensaio com a espécie *L. minor* demonstrou que a espécie se adaptou ao efluente, tendo-se verificado crescimento através do aumento da biomassa. Este crescimento foi superior para as concentrações de 25% e 50% de efluente nos diferentes tempos de ensaio. Para as concentrações mais elevadas nos ensaios de 14 e 21 dias, verificou-se a perda generalizada de pigmentação das frondes. As melhorias obtidas em alguns parâmetros, cor e índice fenólico, sugerem que se mantenha a biomassa fisiologicamente ativa durante o ensaio, procedendo a renovações da mesma ao fim de 7 a 14 dias de contacto. Muito embora a *L. minor* seja um bom organismo para técnicas de fitorremediação serão necessários estudos adicionais com este tipo de efluente, nomeadamente ensaios ecotoxicológicos, para comprovar se de facto há uma redução deste parâmetro, a par com as aparentes melhorias em termos de propriedades químicas.

O ensaio de bioissorção com cortiça permitiu verificar a necessidade de realizar um tratamento preliminar dos granulados testados. Constatou-se ainda que as diferenças entre os tratamentos dependerão dos tempos de exposição à cortiça. O ensaio final de 144 horas com agitação embora não tenha permitido obter resultados distintos do ensaio preliminar para o pH, cor e condutividade, permitiu calcular as taxas de remoção de

diferentes constituintes orgânicos das águas ruças, as quais revelaram reduções ainda que muito baixas. De uma forma geral os resultados obtidos são insuficientes, sendo necessário testar novas formas de contato da cortiça com o efluente de modo a melhorar a sua performance como adsorvente.

Palavras-chave: águas ruças, fitorremediação, *Lemna minor*, bioissorção, cortiça

ABSTRACT

The olive oil industry is an important economic activity in the Mediterranean countries, producing a large amount of a residual effluent named olive mill wastewater (OMW), which represents a serious environmental problem. The chemical composition of OMW is very variable and depends on several factors, but in general their main composition has a high organic load, low pH, intense smell and very dark brown color. The high complexity of its organic constituents, contribute to its resistance to biodegradation, causing negative environmental effects. There is still no generally accepted method of treatment for OMW mainly due to technical and economic limitations.

This work aimed to find answers to this environmental contamination problem, using techniques of phytoremediation and biosorption. To this was divided into two distinct purposes: 1) test the potential of *Lemna minor* to remediate OMW and improve their physical and chemical properties, and finally carried a test biosorption with two types of cork granules for evaluating the potential use of this adsorbent for the treatment of olive mill wastewater.

The tests have shown that *L. minor* can adapt to the effluent and increase its biomass. This increase was higher for concentrations of 25% and 50% of OMW for different contact periods. For higher concentrations in 14 and 21 day tests, there was widespread loss of fronds pigmentation and tissue necrosis. The improvements in some parameters, color and phenolic content, suggest that biomass must remain physiologically active during the tests, by renovation each 7 or 14 days. Although *L. minor* has potential for phytoremediation techniques, additional studies will require the addition of ecotoxicological tests, to perceive if the reduction in the toxicity is occurring in parallel with the improvement of chemical properties of the effluent.

The biosorption assay with cork demonstrated the need for a preliminary treatment of the cork granules. It was also found that differences between treatments depend on the exposure times of the cork. Although the final test of 144 hours with stirring not allowed achieving different results from the preliminary test for pH, color and conductivity. The chemical analysis of the effluent allowed us to calculate the removal rates of different organic constituents of OMW, for which very low reductions were recorded. In general the results obtained are insufficient and it is necessary to test new forms of cork contact with the effluent to improve its performance as an adsorbent.

Key words: olive mill wastewater, phytoremediation, *Lemna minor*, biosorption, cork

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	iii
LISTA DE QUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 – Introdução.....	3
1.2 -Produção de azeite: importância económica e cultural e ambiental em Portugal e nos países do Mediterrâneo.....	4
1.3 - Características químicas do efluente do processamento de azeite.....	5
1.4 - Impacte ambiental das descargas de águas ruças	6
1.5 - Soluções de tratamento possíveis e sua eficácia	9
1.6 - Objetivos e estrutura da tese.....	10
1.7 -Referências Bibliográficas.....	12
CAPÍTULO 1 – Avaliação do uso potencial de <i>lemna minor</i> para fitorremediação de águas ruças.....	15
1. Introdução.....	17
2. Material e Métodos	19
2.1. Águas ruças	19
2.2. Ensaio de viabilidade	20
2.3. Ensaio Final de 14 dias com <i>L. minor</i>	23
2.4. Ensaio de longa duração com <i>L. minor</i>	24
2.5. Análise química do efluente.....	26
2.6. Análise estatística	27
3. Resultados e Discussão	28
3.1. Caracterização do efluente bruto	28
3.2. Ensaio de viabilidade de <i>L. minor</i>	30

3.4. Ensaio de longa duração.....	49
3.4.1 Caraterização do efluente bruto.....	49
4. Conclusões.....	62
5. Referências Bibliográficas	64
CAPÍTULO 2 – Avaliação do uso potencial da cortiça como adsorvente no tratamento de águas ruças	
1. Introdução.....	71
2. Material e Métodos	74
2.1. Caracterização do efluente e do granulado de cortiça.....	74
2.3. Ensaio final com cortiça e agitação contínua.....	76
2.4. Análise química do efluente.....	77
3. Resultados e Discussão	78
3.1. Caracterização do efluente bruto do ensaio preliminar	78
3.2. Ensaio preliminar com a cortiça para tratamento de águas ruças.....	79
3.3. Ensaio final com a cortiça e agitação contínua.....	90
4. Conclusões.....	100
5. Referências Bibliográficas	102
Conclusão final	105
ANEXO I	109
ANEXO II	120

LISTA DE QUADROS

Tabela 1 – Características físicas e químicas gerais das águas ruças.....	6
Tabela 2 – Resumo dos valores limite de emissão para descarga de águas residuais (VLE) – (MA, 1998).....	8
Tabela 1.1 – Desenho experimental do ensaio de viabilidade de <i>L. minor</i> no efluente de lagar de azeite.	21
Tabela 1.2 – Nº de frondes, colónias, peso fresco das frondes e pH das réplicas para ensaios de 7, 14 e 21 dias.	22
Tabela 1.3 – Nº de frondes, colónias, peso fresco das frondes e pH das réplicas do ensaio final de 14 dias.	23
Tabela 1.4 – Condições iniciais do ensaio de longa duração: pH, nº de frondes e peso fresco das frondes.	25
Tabela 1.5 – Caraterização química das águas ruças dos ensaios de viabilidade de 7,14 e 21 dias e ensaio final de 14 dias.	29
Tabela 1.6 – Caraterização química das águas ruças dos ensaios de viabilidade de 7,14 e 21 dias e ensaio final de 14 dias.	29
Tabela 1.7- Valor obtido de biomassa inicial de <i>L. minor</i>	30
Tabela 1.8- Resultados das análises de variância de uma via efetuadas para comparar os parâmetros de crescimento de <i>L. minor</i> , entre tratamentos (diluições de efluente) em cada período de exposição, e dos respetivos testes de Dunnett para avaliação das diferenças relativamente ao controlo.....	40
Tabela 1.9. Resultados das análises de variância de uma via efetuadas para comparar os parâmetros físico-químicos do efluente, entre tempos de exposição para cada tratamento (diluição do efluente).....	45
Tabela 1.10. Resultados obtidos para o índice fenólico no ensaio de viabilidade de 7, 14 e 21 dias.....	45
Tabela 1.11 – Resultados do ensaio de 14 dias para os parâmetros: pH, peso seco (biomassa) e cor.	47
Tabela 1.12 – Caraterização química das águas ruças do ensaio de longa duração com <i>L. minor</i>	49
Tabela 1.13a – Aspeto final de <i>L. minor</i> do ensaio de longa duração sem ajuste de pH.	53
Tabela 1.13b – Aspeto final de <i>L. minor</i> do ensaio de longa duração sem ajuste de pH.	54
Tabela 1.14a – Aspeto final de <i>L. minor</i> do ensaio de longa duração com ajuste de pH.	54
Tabela 1.14b – Aspeto final de <i>L. minor</i> do ensaio de longa duração com ajuste de pH.	55

Tabela 1.15a – Aspeto final do efluente do ensaio de longa duração com e sem ajuste de pH.....	56
Tabela 1.15b – Aspeto final do efluente dos controlos do ensaio de longa duração com e sem ajuste de pH.	57
Tabela 1.16 - Variação dos parâmetros físico-químicos do efluente nos diferentes tratamentos do efluente com e sem ajuste de pH.	61
Tabela 2.1 – Caraterização química das águas ruças do ensaio preliminar com a cortiça.	78
Tabela 2.2 – Caraterização química das águas ruças do ensaio preliminar com a cortiça	79
Tabela 2.3. Resultados da análise de variância de duas vias efetuadas aos parâmetros do efluente e ao volume do granulado para testar o efeito do tratamento e do tempo de exposição. A bold destaca-se efeito não significativo do fator testado.	82
Tabela 2.5 – Caraterização química das águas ruças do ensaio final com agitação contínua.....	90
Tabela 2.6 – Caraterização química das águas ruças do ensaio final com agitação.	90
Tabela 2.7 – Resultados da caraterização química do ensaio final com agitação contínua: Concentração dos diferentes compostos químicos e respetiva taxa de remoção (T.R.) com os dois granulados.	95
Tabela 2.8 – Resultados obtidos para CQO e índice fenólico no ensaio final com agitação contínua.....	99
Tabela A.1 – Resultados do ensaio de viabilidade de 7 dias para os parâmetros: pH, nº frondes, nº colónias, peso fresco e seco, cor, CQO e índice fenólico.....	110
Tabela A.2. – Resultados do ensaio de viabilidade de 14 dias para os parâmetros: pH, nº frondes, nº colónias, peso fresco e seco, cor, CQO e índice fenólico.....	111
n.d.-não determinado.....	111
Tabela A.3. – Resultados do ensaio de viabilidade de 21 dias para os parâmetros: pH, nº frondes, nº colónias, peso fresco e seco, cor, CQO e índice fenólico.....	112
Tabela A.4 – Média dos resultados do ensaio de longa duração com <i>L. minor</i> sem correção de pH.	118
Tabela A.5 – Média dos resultados do ensaio de longa duração com <i>L. minor</i> com correção de pH	119
Tabela A-II-1 - Resultados do ensaio preliminar com o granulado 1.	121
Tabela A-II-2- Resultados do ensaio preliminar com o granulado 2.	121
Tabela A-II-3- Resultados do controlo do ensaio com agitação contínua	122
Tabela A-II-4- Resultados do ensaio com agitação contínua com o granulado 1	122

Tabela A-II-5- Resultados do ensaio com agitação contínua com o granulado 2	123
---	-----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Oliveira com frutos em fase de amadurecimento	3
Figura 2 – Amostra de águas ruças recolhidas no lagar de azeite.	19
Figura 3 – Exemplares de <i>L. minor</i> utilizadas nos ensaios.....	20
Figura 4 – Foto do controlo (1) e ensaio com 25% de efluente de lagar de azeite (2).	30
Figura 5 – Foto 1 e 2 do ensaio com 50% de efluente de lagar de azeite.	31
Figura 6 – Aspeto final de <i>L. minor</i> com 75% efluente de lagar de azeite.	31
Figura 7 – Aspeto final de <i>L. minor</i> com 100% efluente de lagar de azeite.	32
Figura 8 – Foto do controlo para o ensaio de 14 dias.	32
Figura 9 – Foto da réplica do ensaio de 14 dias com concentração de 50% de efluente bruto.	33
Figura 10 – Foto da pigmentação de <i>L. minor</i> no ensaio de 14 dias com concentração de 50% de efluente bruto.....	33
Figura 11 – Foto do ensaio de 14 dias com concentração de 75% de efluente bruto.	34
Figura 12 – Fotos da pigmentação de <i>L. minor</i> no ensaio de 14 dias com concentração de 75% de efluente bruto.....	34
Figura 13 – Foto 1 e 2 de <i>L. minor</i> no ensaio de viabilidade de 21 dias com 25% de efluente bruto.....	35
Figura 14 – Fotos 1 e 2 de <i>L. minor</i> no ensaio de viabilidade de 21 dias com 75% de efluente bruto.....	36
Figura 15. Variação do número médio de frondes de <i>L. minor</i> entre tratamentos e tempo de exposição. As barras de erro representam o desvio padrão e as letras a, b e c, representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre tempos para cada um dos tratamentos, segundo o teste de Tukey HSD de comparações múltiplas.	38
Figura 16. Variação do número médio de colónias de <i>L. minor</i> entre tratamentos e tempo de exposição. As barras de erro representam o desvio padrão e as letras a, b e c, representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre tempos para cada um dos tratamentos, segundo o teste de Tukey HSD de comparações múltiplas.	39
Figura 17. Variação do peso fresco médio de <i>L. minor</i> entre tratamentos e tempo de exposição. As barras de erro representam o desvio padrão e as letras a, b e c, representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre tempos para cada um dos tratamentos, segundo o teste de Tukey HSD de comparações múltiplas.	39
Figura 18. Variação do peso seco médio de <i>L. minor</i> entre tratamentos e tempo de exposição. As barras de erro representam o desvio padrão e as letras a, b e c,	

representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre tempos para cada um dos tratamentos, segundo o teste de Tukey HSD de comparações múltiplas.	40
Figura 19. Variação do parâmetro pH entre tratamentos e tempos de exposição. As barras de erro representam o desvio padrão e as letras a, b e c, representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre tempos para cada um dos tratamentos, segundo o teste de Tukey HSD de comparações múltiplas.	42
Figura 20. Variação do parâmetro cor entre tratamentos e tempos de exposição. As barras de erro representam o desvio padrão e as letras a, b e c, representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre tempos para cada um dos tratamentos, segundo o teste de Tukey HSD de comparações múltiplas.	43
Figura 21. Variação do parâmetro CQO entre tratamentos e tempos de exposição. As barras de erro representam o desvio padrão.	44
Figura 22 – Imagens (Ampliação 1.0x) de <i>L. minor</i> de uma réplica com 25% (1), 50% (2), 75% (3) e 100% (4) de efluente de lagar de azeite.	48
Figura 23 – Foto do ensaio de longa duração com <i>L. minor</i> no final de 7 dias.	49
Figura 24 – Foto do aspeto final de <i>L. minor</i>	50
Figura 25 – Foto do aspeto final de <i>L. minor</i> no ensaio sem ajuste de pH.	51
Figura 26 – Aspeto final de <i>L. minor</i> com acumulação de resíduo do ensaio sem ajuste de pH.	52
Figura 27 – Aspeto final de <i>L. minor</i> com acumulação de resíduo do ensaio com ajuste de pH.	52
Figura 28 – Foto do efluente coberto totalmente por <i>L. minor</i>	55
Figura 29. Número médio de frondes, no final de cada 7 dias de renovação, para o ensaio de longa duração, sem ajuste de pH. As barras representam o desvio padrão e as letras representam as diferenças significativas entre grupos com base no teste de Tukey- HSD.	58
Figura 30. Peso seco médio, no final de cada 7 dias de renovação, para o ensaio de longa duração, sem ajuste de pH (esquerda). E no início e no final do ensaio para as réplicas sem renovação de plantas (direita). As barras representam o desvio padrão e as letras representam as diferenças significativas entre grupos com base no teste de Tukey- HSD. O asterisco indica diferenças significativas entre grupos.	58
Figura 31. Número médio de frondes, no final de cada 7 dias de renovação, para o ensaio de longa duração, com ajuste de pH. As barras representam o desvio padrão e as letras representam as diferenças significativas entre grupos com base no teste de Tukey- HSD.	59

Figura 32. Peso seco médio, no final de cada 7 dias de renovação, para o ensaio de longa duração, com ajuste de pH (esquerda). E no início e no final do ensaio para as réplicas sem renovação de plantas (direita). As barras representam o desvio padrão e as letras representam as diferenças significativas entre grupos com base no teste de Tukey-HSD. O asterisco indica diferenças significativas entre grupos.	60
Figura 33. Sobreiro	72
Figura 34. Granulados utilizados no ensaio: (1) granulado 1, (2) granulado 2.	75
Figura 35. Aspeto final do efluente exposto ao contacto com os granulados 1 e 2 durante 12 horas, apenas com agitação manual ocasional.	80
Figura 36. Controlo dos ensaios com granulados 1 e 2 com água destilada após filtração para o tempo de 12 horas.	80
Figura 37. Variação do pH no ensaio realizado com o granulado 1 de cortiça. As barras de erro representam o desvio padrão e as letras representam diferenças significativas entre o controlo de efluente e o efluente tratado com cortiça, em cada um dos tempos de exposição. As letras representam diferenças significativas entre tratamentos, para cada um dos tempos de exposição ($p < 0,05$).	84
Figura 38. Variação do pH nos ensaios realizados com o granulado 2 de cortiça. As barras de erro representam o desvio padrão e as letras representam diferenças significativas entre o controlo de efluente e o efluente tratado com cortiça, para cada um dos tempos de exposição. As letras representam diferenças significativas entre tratamentos, para cada um dos tempos de exposição ($p < 0,05$).	84
Figura 39. Variação da cor no ensaio realizado com o granulado 1 de cortiça. As barras de erro representam o desvio padrão e as letras representam diferenças significativas entre o controlo de efluente e o efluente tratado com cortiça, para cada um dos tempos de exposição. As letras destacam diferenças significativas entre tratamentos para cada tempo de exposição ($p < 0,05$).	86
Figura 40. Variação da cor no ensaio realizado com o granulado 2 de cortiça. As barras de erro representam o desvio padrão.	86
Figura 41. Variação da condutividade no ensaio realizado com o granulado 1 de cortiça. As barras de erro representam o desvio padrão. Letras representam diferenças significativas entre tempos, dentro de cada tratamento.	87
Figura 42. Variação da condutividade no ensaio realizado com o granulado 2 de cortiça. As barras de erro representam o desvio padrão.	88
Figura 43. Variação do volume no ensaio realizado com o granulado 1 de cortiça. As barras de erro representam o desvio padrão e as letras representam diferenças significativas entre tratamentos para cada um dos tempos de exposição. As letras	

correspondem a diferenças significativas entre tempos de exposição para cada um dos tratamentos ($p < 0,05$).....	89
Figura 44. Variação do volume no ensaio realizado com o granulado 2 de cortiça. As barras de erro representam o desvio padrão e as letras representam diferenças significativas entre tratamentos para cada um dos tempos de exposição	89
Figura 45. Resultado visual do ensaio com águas ruças e granulado 1 (1) e granulado 2 (2) após agitação contínua durante 144 horas.	92
Figura 46. Resultado visual do controlo com efluente sem cortiça no ensaio com águas ruças após agitação contínua durante 144 horas.....	92
Figura 47. Resultado visual do controlo com água destilada do ensaio com granulado 1 (a) e granulado 2 (b) após agitação contínua durante 144 horas.	93
Figura 48. Aspeto do controlo tratado com granulado 1 (a) e granulado 2 (b) após filtração.	94
Figura 51 – Foto do ensaio de viabilidade de 14 dias para concentração de 25% de efluente bruto.....	113
Figura 52 – Foto do ensaio de viabilidade de 14 dias para concentração de 25% de efluente bruto.....	113
Figura 53 – Fotos das réplicas R1 (1) e R3 (2) do ensaio de viabilidade de 14 dias com concentração de 100% de E.B.....	114
Figura 54 – Foto 1e 2 de <i>L. minor</i> no ensaio de viabilidade de 14 dias com concentração de 100% de E.B para as réplicas R1 e R3 respetivamente	115
Figura 55 – Fotos 1 e 2 de <i>L. minor</i> no controlo do ensaio de 21 dias	115
Figura 56 – Aspeto de <i>L. minor</i> no ensaio de 21 dias com 50% de E.B.	116
Figura 57 – Fotos 1 da réplica 3, foto 2 e 3 de <i>L. minor</i> no ensaio de 21 dias com 100% de E.B.....	117

LISTA DE ABREVIATURAS

CBO ₅	Carência Bioquímica de Oxigénio para 5 dias
CQO	Carência Química de Oxigénio
E.B.	Efluente Bruto
FT	Fenóis totais
NaOH	Hidróxido de sódio
SST	Sólidos suspensos totais
VLE	Valores limite de emissão

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 – Introdução

O cultivo da oliveira iniciou-se há 6000 anos nas margens mediterrâneas da Síria e Palestina tendo sido difundido até ao Egito, através de Creta. No séc. XVI a.C. foram os Fenícios que levaram a oliveira para as ilhas gregas, espalhando-a posteriormente pela Grécia continental. No séc. VI a.C. o cultivo da oliveira estava já difundido por toda a região mediterrânica (Luchetti, 2002).

A expansão do Império Romano foi igualmente importante na difusão das plantações de oliveira na bacia do Mediterrâneo assim como no processamento do azeite. A Península Ibérica e a costa do norte de África tornaram-se grandes áreas de produção de azeite que era transportado em ânforas para Inglaterra, Alemanha, França e Itália. Nessa época o azeite tem utilizações bem documentadas, sendo fundamentalmente usado como combustível de lâmpadas (Vossen, 2007).

A oliveira é uma planta arbórea, membro da família Oleaceae, da qual apenas a *Olea europaea*, produz frutos (drupas) comestíveis, grandes, carnudos e ricos em óleos (figura 1). É uma árvore perene pequena com uma altura média de 3 a 5 metros. Necessita de um clima temperado, e consegue desenvolver-se com pouca precipitação, o que corresponde não apenas ao clima típico do Mediterrâneo, mas também da Califórnia, África do Sul, Austrália, Japão e China, Peru, México, Chile e Argentina (Azbar *et al.*, 2004).



Figura 1 – Oliveira com frutos em fase de amadurecimento

1.2 -Produção de azeite: importância económica e cultural e ambiental em Portugal e nos países do Mediterrâneo

Os países da União Europeia são os maiores produtores de azeite, com cerca de 75% da produção mundial. O maior produtor é a Espanha com 46,2%, seguido de Itália com 15,2%, Grécia com 10,6% e Portugal com 1,9% (IOOC, 2010) e desta forma, a produção de azeite é uma atividade económica importante para estes países.

O consumo do azeite proporciona benefícios para a saúde humana, tais como a redução do risco de doenças coronárias, prevenção de diversos tipos de cancro e modificação das respostas imunes e anti-inflamatórias. A incidência deste tipo de problemas de saúde é significativamente mais reduzido nos países com maior consumo de azeite (Itália, Espanha e Grécia) que seguem uma típica dieta mediterrânica (Tuck e Hayball, 2002).

Existem diversos métodos usados na produção do azeite, originando diferentes subprodutos dependendo do sistema de extração utilizado. O sistema tradicional descontínuo dos lagares de azeite utiliza prensas que originam uma mistura de azeite, água e resíduos cuja separação é realizada por decantação. Este sistema descontínuo foi substituído por métodos de decantação e de centrifugação contínua que separam o azeite dos sólidos e podem ser de duas fases ou três fases diferindo na quantidade de água utilizada (Niaounakis e Halvadakis, 2006).

O impacto ambiental da produção de azeite é considerável devido principalmente à utilização de elevadas quantidades de água e, subsequentemente à produção de elevadas quantidades de águas residuais ou águas ruças. O sistema de produção de 3 fases produz maior quantidade de água residual do que o sistema de produção de 2 fases que reduz drasticamente o consumo de água durante o processo mas, mesmo assim, continua a produzir uma elevada quantidade de águas ruças. O método de produção em 2 fases foi bem implementado em Espanha mas nos restantes países continua a predominar o método de produção de 3 fases (McNamara *et al.*, 2008).

O tratamento das águas ruças é dificultado pela complexa composição química das mesmas que depende de vários fatores tais como: a variedade da azeitona, sistema de cultivo, grau de maturação do fruto e tipo de processo de extração. A grande variedade de componentes existentes nas águas ruças requer diferentes tecnologias para eliminar os poluentes com efeitos nocivos no meio ambiente (Yay *et al.*, 2012).

1.3 - Caraterísticas químicas do efluente do processamento de azeite

As águas ruças resultantes da produção do azeite são um efluente de cor vermelha, escura ou preta. Esta coloração muito caraterística deve-se fundamentalmente à presença de compostos fenólicos poliméricos (Tsioulpas *et al.*, 2002).

É um efluente constituído por cerca de 83-96% de água, 3,5-15% de matéria orgânica e 0,5-2% de sais minerais (Asses *et al.*, 2009). Possui uma elevada carga orgânica, com valores de carência química de oxigénio (CQO) entre 50 a 150 g l⁻¹ e um pH ácido entre 4 e 6. A fração orgânica contém elevadas quantidades de proteínas, lípidos, polissacarídeos e compostos fitotóxicos que inibem a germinação e o crescimento das plantas (Linares *et al.*, 2003), assim como de compostos com propriedades anti-microbianas (Capasso *et al.*, 1995; Ramos-Cormenzana *et al.*, 1996; Morillo *et al.*, 2009; Tafesh *et al.*, 2011).

Os compostos fenólicos que estão presentes nos caroços e na polpa da azeitona tendem a ser mais solúveis na fase aquosa do que no azeite, resultando em intervalos de concentração de 0,5 a 25 g l⁻¹ nas águas ruças. Estão já identificados mais de 30 compostos fenólicos nas águas ruças resultantes da produção do azeite, e as concentrações citadas variam significativamente (McNamara *et al.*, 2008). São normalmente divididos em três categorias: derivados de ácido cinâmico, derivados de ácido benzóico e derivados de tirosol (Justino *et al.* 2011).

A quantidade de fenóis presentes no efluente depende do cultivo e maturação do fruto, condições climáticas e tempo de armazenamento, assim como do processo de extração (Allouche *et al.*, 2004; Roig *et al.*, 2006; Kallel *et al.*, 2009). Os compostos fenólicos têm ainda tendência durante o armazenamento a converter-se, por ação de polimerases, em polímeros de elevado peso molecular, os quais são compostos particularmente difíceis de degradar (Ayed *et al.* 2005; Crognale *et al.* 2006; Justino *et al.*, 2009).

A elevada quantidade de compostos fenólicos e sólidos suspensos bem como o teor ácido do efluente, contribuem para a natureza recalcitrante do mesmo. A composição complexa das águas ruças em conjunto com a natureza sazonal de produção de azeite e dispersão geográfica dos lagares contribui para uma barreira técnica e económica para o correto e eficiente tratamento e rejeição deste efluente (McNamara *et al.*, 2008).

Na tabela 1 resumem-se as caraterísticas físicas e químicas de efluentes resultantes da produção de azeite obtidas de diversos autores.

Tabela 1 – Características físicas e químicas gerais das águas ruças

Parâmetros					Origem águas ruças (processo extração)	Referências
pH	CBO ₅ ^a (g l ⁻¹)	CQO ^b (g l ⁻¹)	SST ^c (g l ⁻¹)	FT ^d (g l ⁻¹)		
4.1	3.4	255	25	6.3	Marrocos (descontínuo)	El Hadrami <i>et al.</i> (2004)**
5.4	47.8	105	46.1	0.01	Grécia (contínuo – 3fases)	Fountoulakis <i>et al.</i> (2002)**
5.3	50.0	140	95.0	3.4	Grécia (contínuo – 3 fases)	Tsioulpas <i>et al.</i> (2002)
5.2	12.5	36.9	4.5	-	Tunísia (N.I.)	Khoufi <i>et al.</i> (2007)
3.9-4.1	-	21.8-75	-	0.1-0.4	Portugal (contínuo – 3 fases)	Justino <i>et al.</i> (2009) [*]
4.6 – 5.0	15.6-18.4	54.6-62.5	38.6-43.8	-	Tunísia (N.I.)	Mekki <i>et al.</i> (2008)
4.5-5.2	50-100	80.0-200	20.0-120	2-15	Turquia (N.I.)	Mert <i>et al.</i> (2010)

^a Carência bioquímica de oxigénio^b Carência química de oxigénio^c Sólidos suspensos totais^d Fenóis totais

N.I. – Não identificado

* - efluente armazenado; ** - efluente fresco

1.4 - Impacte ambiental das descargas de águas ruças

A gestão e o tratamento das águas ruças representam um problema importante principalmente nos países do Mediterrâneo uma vez que anualmente se estima que sejam produzidos 10-30 milhões de m³ deste efluente (Niaounakis e Halvadakis, 2006).

Embora as águas ruças resultem do processamento de um fruto, e os seus constituintes sejam por definição biodegradáveis, os compostos fenólicos e lípidos decompõem-se

muito mais lentamente do que os outros constituintes tais como os açúcares e ácidos voláteis de cadeia curta (Rozzi *et al.*, 1996).

A difícil biodegradação, em conjunto com a elevada carga orgânica levou a considerar este efluente responsável por graves danos no ambiente, uma vez que durante muitos anos foi rejeitado para os sistemas aquáticos e solos sem qualquer tipo de tratamento com prejuízo da microflora, plantas e espécies aquáticas (Aggelis *et al.*, 2003; Roig *et al.*, 2006).

A carga orgânica das águas ruças é muito superior à existente numa água residual doméstica e quando rejeitada num sistema aquático diminui a disponibilidade de oxigénio; também a concentração elevada de nutrientes provoca eutrofização dos sistemas aquáticos como resultado do desenvolvimento excessivo de algas (Kapellakis *et al.*, 2008).

A elevada concentração de polifenóis que contribuem para a cor muito escura do efluente, provocam a alteração da cor de rios e sistemas aquáticos quando rejeitados nos mesmos (Kapellakis *et al.*, 2008).

Durante o armazenamento das águas ruças em tanques, método de evaporação muito comum que permite acomodar grandes quantidades de efluente para posterior tratamento, ou até mesmo durante a rejeição em solos ou sistemas aquáticos ocorrem fenómenos de fermentação com emissão de gases como o metano ou ácido sulfídrico, causando maus odores ao longo de distâncias consideráveis principalmente durante o processo de produção (Niaounakis e Halvadakis, 2004).

A presença de compostos fenólicos nas águas ruças causa um elevado impacto quando rejeitadas nos sistemas aquáticos ou nos solos, dado que são compostos muito tóxicos que contribuem para a natureza/caraterística complexa e recalcitrante deste efluente residual (Albuquerque *et al.*, 2004; Crognale *et al.*, 2006). Os lípidos existentes nas águas ruças formam um filme nas superfícies aquáticas, impedindo a passagem de luz e oxigénio para os organismos e reduzindo o crescimento das plantas (Kapellakis *et al.*, 2008). Devido aos impactos ambientais causados, os lagares de azeite têm sido obrigados a tratar e a reduzir substancialmente as águas ruças resultantes da produção do azeite.

A Diretiva Quadro da Água (Diretiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu do Conselho, de 23 de Outubro de 2000), principal instrumento da política da União Europeia relativa à água, estabelece um quadro de ação comunitária para proteção das águas de superfície interiores, das águas de transição, das águas costeiras e águas subterrâneas. Segundo

esta Diretiva, todos os estados membros têm de estabelecer valores limites para a descarga de certos poluentes no meio aquático, nomeadamente para as substâncias que têm um impacto negativo nas massas de água (CE, 2000). O Decreto de Lei 236/98, de 1 de agosto estabelece as normas, critérios e objetivos de qualidade com a finalidade de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função dos seus principais usos. Relativamente à descarga de águas residuais define valores de limite de emissão (VLE) para as mesmas (MA, 1998). Alguns desses VLE para descarga de águas residuais estão resumidos na tabela 2.

Tabela 2 – Resumo dos valores limite de emissão para descarga de águas residuais (VLE) – (MA, 1998)

Parâmetro	VLE
pH	6-9
SST/ (mg L ⁻¹)	60
CQO/ (mg L ⁻¹)	150
CBO ₅ , 20°C (mg L ⁻¹)	40
Fenóis (mg L ⁻¹ de fenol)	0,5

Comparando os valores da tabela 2 (VLE) com os valores obtidos para os mesmos parâmetros na tabela 1 que resume valores caraterísticos das águas ruças, verifica-se que estas excedem os valores permitidos por lei para a descarga nos cursos de água superficiais. Por outro lado, o Decreto Regulamentar nº23/95, de 23 de Agosto, que regulamenta o sistema de distribuição pública e predial de água e de drenagem pública e predial de águas residuais, proíbe a condução das águas ruças para as redes públicas de drenagem, referindo que se deve assegurar a condução das mesmas para locais apropriados (nº3, art. 196) (MOPTC, 1995). Sem grandes alternativas no que refere ao destino a dar às águas ruças, foi publicado no ano 2000, o Despacho Conjunto nº 626/2000, de 6 de Junho, que prevê a possibilidade de aplicação de águas ruças em solos agrícolas (apenas em culturas arbustivas e arbóreas) e que regula a aplicação em causa. Contudo, os estudos dedicados à avaliação dos efeitos das águas ruças nas propriedades do solo, na biota e nas culturas são ainda escassos e contraditórios (Azbar *et al.*, 2004; Kotsou *et al.*, 2004; Saadi *et al.*, 2007; Andreozzi *et al.*, 2008), pelo que continua a ser fundamental a pesquisa de soluções de tratamento para este efluente.

1.5 - Soluções de tratamento possíveis e sua eficácia

A elevada carga orgânica recalcitrante das águas ruças, associada à sua elevada toxicidade, tornam o seu tratamento crucial. O fato da produção de azeite ser sazonal é um aspeto problemático, e deste modo o tratamento das águas ruças deve ser suficientemente flexível de modo a operar de uma forma descontínua pois caso contrário continua a ser necessário manter o armazenamento do efluente (Paraskeva e Diamadopoulos, 2006).

O tratamento das águas ruças tem sido objeto de diversos estudos, muitos deles focalizados em métodos de tratamento físico-químicos e biológicos que apenas promovem a remoção da carga orgânica do efluente (Khoufi *et al.*, 2007). A redução da CQO e/ou a remoção da cor do efluente pela combinação dos métodos está bem documentada por diversos autores. Os métodos físico-químicos incluem ozonização, coagulação, ultrafiltração, oxidação eletroquímica e os métodos biológicos incluem processos aeróbios ou anaeróbios (Mantzavinos e Kalogerakis, 2005; Roig *et al.*, 2006; McNamara *et al.*, 2008). No entanto, apesar do elevado número de estudos existentes, na maioria deles não existe registo de ensaios ecotoxicológicos para avaliar a toxicidade das águas ruças antes e após tratamento (Justino *et al.*, 2012).

Os tratamentos biológicos são considerados ambientalmente compatíveis e dos menos dispendiosos entre os métodos de tratamento de águas residuais. No caso dos processos aeróbios, estes são aplicados a efluentes com baixas cargas orgânicas e/ou concentração de nutrientes, ou ainda como uma etapa preliminar de remoção de matéria orgânica e nutrientes das águas ruças. Os processos anaeróbios, por outro lado, são aplicados a efluentes com elevada carga orgânica (Niaounakis e Halvadakis, 2004).

A presença, no entanto, de alguns grupos inibitórios ou mesmo de compostos tóxicos tais como os polifenóis reduz a eficácia dos tratamentos biológicos de águas ruças. O estudo realizado por Justino *et al.* (2009) comparou a eficiência do tratamento biológico deste tipo de efluente em dois períodos diferentes: um imediatamente após o período de produção e outro um ano após produção. A degradação biológica foi realizada por fungos da podridão branca em águas ruças diluídas. Para a mesma diluição, verificou-se que ao fim de um ano ocorreu uma menor redução do conteúdo fenólico do que no efluente tratado imediatamente após o período de produção. Estes resultados podem ser explicados pela tendência dos compostos fenólicos auto-oxidarem durante o período de armazenamento em tanques abertos, ocorrendo a polimerização em compostos fenólicos de elevada massa molecular, que são mais difíceis de degradar biologicamente (Tsagaraki *et al.*, 2007).

Os processos de oxidação avançada (POAs) são os tratamentos físico-químicos mais aplicados no tratamento de águas ruças. Consistem na utilização de agentes oxidantes fortes (ozono, peróxido de hidrogénio em conjunto com radiação UV e reagente Fenton), que formam um radical oxidante muito reativo, em particular o radical hidroxilo (OH^\bullet) que promove a remoção parcial ou total do conteúdo orgânico das águas ruças (Justino *et al.*, 2012). O processo Fenton é muito rentável e fácil de aplicar quando se pretende uma elevada redução de CQO e cor (Lee e Shoda, 2008), mas este tipo de tratamento conduz ao aumento da toxicidade do efluente devido, entre outros, à formação de radicais livres (Justino *et al.*, 2012).

Com efeito vários estudos realizados têm demonstrado que em alguns casos a oxidação química leva à formação de compostos intermediários que podem ser mais recalcitrantes e tóxicos do que os compostos presentes inicialmente no efluente (Gotsi *et al.*, 2005). Quanto à utilização de ozono não existem dados suficientes relativamente à redução da toxicidade do efluente (Mantzavinos e Kalogerakis, 2005).

Muito embora os tratamentos aplicados a este efluente consigam reduzir os compostos fenólicos, CQO e cor, a toxicidade pode permanecer constante e até mesmo aumentar. Por este motivo torna-se necessária a avaliação da toxicidade antes, durante e após tratamento, de modo a evitar obter um efluente final com menor conteúdo orgânico mas mais tóxico do que o efluente original (Justino *et al.*, 2012).

Será igualmente necessária investigação adicional de modo a transpor os resultados obtidos em laboratório em condições controladas, com pequenos volumes de efluente, para as condições reais de tratamento.

1.6 - Objetivos e estrutura da tese

Este trabalho teve dois objetivos principais, estando por isso dividido em dois capítulos distintos, com os seguintes títulos e respetivos objetivos de estudo:

- Capítulo I – Avaliação do uso potencial de *Lemna minor* para fitorremediação de águas ruças- Este capítulo teve como objetivo avaliar a viabilidade e capacidade da espécie *Lemna minor* (lentilha-de-água), para melhorar as propriedades físico-químicas de águas residuais resultantes do processamento e produção do azeite (águas ruças);
- Capítulo II – Avaliação do uso potencial de cortiça como material natural adsorvente no tratamento de águas ruças -, Este capítulo teve como objetivo avaliar a viabilidade e capacidade da cortiça para melhorar as propriedades físico-químicas de águas ruças por bioissorção.

Os dois capítulos foram precedidos por uma introdução geral que faz uma descrição do estado da arte relativo às águas ruças produzidas pela indústria do azeite, às suas características químicas, à legislação que regulamenta as descargas e às dificuldades associados ao desenvolvimento de um tratamento que seja eficaz na redução da sua perigosidade para os meios recetores. A dissertação termina com uma secção de conclusões gerais onde se faz um balanço global dos resultados produzidos no presente trabalho e do modo como os mesmos podem estar na base de estudo futuros que visem o tratamento de águas ruças por fitorremediação ou bioissorção com cortiça.

1.7 -Referências Bibliográficas

Aggelis G., Iconomou D., Christou M., Bokas D., Kotzailias S., Christou G., Tsagou V., Papanikolaou S., 2003. Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. *Water Res* 37: 3897 – 3904.

Albuquerque J.A., González J., García D., Cegarra J., 2004. Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction *Bioresour Technol* 91: 195 – 200.

Allouche N., Fki I., Sayadi S., 2004. Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *J Agric Food Chem* 52: 267 – 273.

Andreozzi R., Canterino M., Di Somma I., Lo Giudice R., Marotta R., Pinto G., Pollio A., 2008. Effect of combined physico-chemical processes on the phytotoxicity of olive mill wastewaters. *Water Res* 42: 1684 – 1692.

Asses N., Ayed L., Bouallagui H., Sayadi S., Hamdi M., 2009. Biodegradation of different molecular-mass polyphenols derived from olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *Int Biodeter Biodegr* 63: 407 – 413.

Ayed L., Assas N., Sayadi S., Hamdi M., 2005. Involvement of lignin peroxidase in the decolourization of black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *Lett Appl Microbiol* 40: 7 – 11.

Azbar N., Bayram A., Filibeli A., Muezzinoglu A., Sengul F., Ozer A., 2004. A review of waste management options in olive oil production. *Crit Rev Environ Sci Technol* 34: 209 – 247.

Capasso R., Evidente A., Schivo L., Orru G., Marcialis M.A., Cristinzio G., 1995. Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *J Appl Bacteriol* 79: 393 – 398.

Crognale S., D’Annibale A., Federici F., Fenice M., Quarantino D., Petruccioli M., 2006. Olive oil mill wastewater valorisation by fungi. *J Chem Technol Biotechnol* 81: 1547 – 1555.

CE – Comissão Europeia, 2000. DIRETIVA 2000/60/CE, 2000. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* L 327: 1 - 72.

El Hadrami A., Belaqqiz M., El Hassni M., Hanifi S., Abbad A., Capasso R., Gianfreda L., El Hadrami I., 2004. Physico-chemical characterization and effects of olive oil mill wastewaters fertirrigation on the growth of some Mediterranean crops. *Agron J* 3: 247 – 254.

Fountoulakis M.S., Dokianakis S.N., Kornaros M.E., Aggelis G.G., Lyberatos G., 2002. Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Res* 36: 4735 – 4744.

Gotsi M., Kalogerakis N., Psillakis E., Samaras P., Mantzavinos D., 2005. Electrochemical oxidation of olive oil mill wastewaters. *Water Res* 39: 4177 – 4187.

International Olive Oil Council (2010) World and EU olive oil figures. <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131>- world-olive-oil-figures.

Justino C.I., Duarte K., Loureiro F., Pereira R., Antunes S.C., Marques S.M., Gonçalves F., Rocha-Santos T.A.P., Freitas A.C., 2009. Toxicity and organic content characterization of olive oil mill wastewater undergoing a sequential treatment with fungi and photo-Fenton oxidation. *J Hazard Mat* 172: 1560 – 1572.

Justino C.I., Pereira R., Freitas A.C., Rocha-Santos T., Panteleitchouk T., Duarte A.C., 2012. Olive oil mill wastewater before and after treatment: a critical review from the ecotoxicological point of view. *Ecotoxicol* 21: 615 – 629.

Kallel M., Belaid C., Mechichi T., Ksibi M., Elleuch B., 2009. Removal of organic load and phenolic compounds from olive mill wastewater by Fenton oxidation with zero-valent iron. *Chem Eng J* 150: 391 – 395.

Kapellakis I.E., Tsagarakis K.P., Crowther J., 2008. Olive oil history, production and by-product management. *Rev Environ Sci Biotechnol* 7: 1 - 26.

Khoufi S., Feki F., Sayadi S., 2007. Detoxification of olive mill wastewater by electrocoagulation and sedimentation processes. *J Hazard Mater* 142: 58 – 67.

Kotsou M., Mari J., Lasaridi K., Chatzipavlidis J., Balis C., Kyriacou A., 2004. The effect of olive oil mill wastewater (OMW) on soil microbial communities and suppressiveness against *Rhizoctonia solani*. *Appl Soil Ecol* 26: 113 – 121.

Lee H., Shoda M., 2008. Removal of COD and color from livestock wastewater by the Fenton method. *J Hazard Mater* 153: 1314 – 1319.

Linares A., Caba J.M., Ligeró F., De la Rubia T., Martínez J., 2003. Detoxification of semisolid olive-mill wastes and pine-chip mixtures using *Phanerochaete flavidio-alba*. *Chemosphere* 51: 887 – 891.

Luchetti F., 2002. Importance and future of olive oil in the world market – an introduction to olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 559-563.

Mantzavinos D., Kalogerakis N., 2005. Treatment of olive mill effluents. Part I. Organic matter degradation by chemical and biological processes—an overview. *Environ Int* 31: 289 – 295.

McNamara C.J., Anastasiou C.C., O’Flaherty V., Mitchell R., 2008. Bioremediation of olive mill wastewater. *Int Biodeter Biodegr* 61: 127 – 134.

Mekki A., Dhouib A., Feki F., Sayadi S., 2008. Assessment of toxicity of the untreated and treated olive mill wastewaters and soil irrigated by using microbioassays. *Ecotox Environ Saf* 69: 488– 495.

Mert B.K., Yonar T., Kilic, M.Y., Kestioglu K., 2010. Pre-treatment studies on olive oil mill effluent using physicochemical, Fenton and Fenton-like oxidations processes. *J Hazard Mater* 174: 122 – 128.

Ministério do Ambiente, 1998. Decreto-Lei nº 236/98 de 1 de Agosto de 1998. Diário da República, 1ª Série-A, nº 176, 3676- 3722.

Ministério das Obras Públicas, Transportes e Comunicações, 1995. Decreto Regulamentar nº 23/95 de 23 de Agosto de 1995. Diário da República, 1ª Série-B, nº 194, 5284 - 5319.

Niaounakis M., Halvadakis C.P., 2004. Olive mill waste management. Literature Review and Patent Survey. Typothito- George Dardanos. Athens, Greece, pp xiv, 430.

Niaounakis M., Halvadakis C.P., 2006. Olive processing waste management: literature review and patent survey, second ed. Elsevier, Amsterdam.

Paraskeva P., Diamadopoulos E., 2006. Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: a review. J. Chem. Technol. Biotechnol. 81: 1475 - 1485.

Ramos-Cormenzana A., Juárez-Jiménez B., Garcia-Pareja MP., 1996. Antimicrobial activity of olive mill waste-waters (alpechin) and biotransformed olive oil mill wastewater. Int Biodet Biodeg 38: 283 – 290.

Roig A., Cayuela M.L., Sanchez-Monedero M.A., 2006. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. Waste Manag 26: 960 – 969.

Rozzi A., Malpei F., 1996. Treatment and disposal of olive mill effluents. Internat. Biodeterioration & Biodegradation 135-144.

Saadi I., Laor Y., Raviv M., Medina S., 2007. Land spreading of olive mill wastewater: effects on soil microbial activity and potential phytotoxicity. Chemosphere 66: 75 – 83.

Tafesh A., Najami N.; Jadoun, J., Halahlih, F., Riepl, H., Azaizeh, H., 2011. Synergistic Antibacterial Effects of Polyphenolic Compounds from Olive Mill Wastewater. Evidence-Based Complementary and Alternative: 1 – 9.

Tsagaraki E., Larazides H.N., Petrotos K.B., 2007. Olive mill wastewater treatment. In: Oreopoulou V, Russ W (eds) Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry. Springer, New York, pp 133–157.

Tsioulpas A., Dimou D., Iconomou D., Aggelis G., 2002. Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus spp.* in respect to their phenol oxidase (*laccase*) activity. Bioresour Technol 84: 251 – 257.

Tuck K.L., Hayball P.J., 2002. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. J Nutr Biochem 13: 636 – 644.

Vossen P., 2007. Olive Oil: History, Production, and Characteristics of the World's Classic Oils. HortScience Vol. 42(5) August.

Yay A.S.E., Oral H.V., Onay T.T., Yenigun O., 2012. A study on olive oil mill wastewater management in Turkey: A questionnaire and experimental approach. Resources, Conservation and Recycling 60: 64 – 71.

CAPÍTULO 1 – AVALIAÇÃO DO USO POTENCIAL DE *LEMNA MINOR* PARA FITORREMEDIAÇÃO DE ÁGUAS RUÇAS

1. Introdução

A fitorremediação é uma técnica de tratamento que pode ser utilizada em casos de contaminação ambiental de água, sedimentos e solos. Esta técnica sustentável utiliza plantas, que por processos biológicos, removem, decompõem ou acumulam substâncias tóxicas ou indesejáveis presentes em sistemas poluídos (Susarla *et al.*, 2002; Rai, 2009).

As espécies de plantas com potencial na fitorremediação devem possuir certas propriedades, tais como: tolerância, capacidade de extração e acumulação, transformação, degradação ou volatilização dos contaminantes em níveis que são tóxicos para as plantas vulgares e devem ser capazes de crescer rapidamente e aumentar a sua biomassa. Da mesma forma, uma espécie com potencial para a fitorremediação deve ser capaz de tolerar e de preferência, de lidar simultaneamente com múltiplos poluentes uma vez que em cenários de poluição raramente ocorre um único poluente isolado (Ochs *et al.*, 1993; Horst, 1995; Schnoor *et al.*, 1995; Dakora e Phillips, 2002; Miretzky *et al.*, 2004; Tu *et al.*, 2004).

As vantagens na utilização da fitorremediação são os baixos custos associados, a possibilidade de aplicação *in situ* em áreas extensas e para diferentes tipos de poluentes assim como a fácil monitorização das plantas. A demora na obtenção de resultados, a dependência do clima e condições do local, assim como a incapacidade de eliminar os poluentes na sua totalidade, são as principais desvantagens deste processo de tratamento (Shan *et al.*, 2009).

Muitas espécies de macrófitas são usadas na investigação de novos tratamentos de águas residuais por fitorremediação. Estas plantas podem ser aplicadas na superfície de lagoas e contribuem na remoção de nutrientes, assim como de sólidos suspensos e matéria orgânica (Caicedo *et al.*, 2000).

Uma das famílias de plantas aquáticas vulgarmente usadas em fitorremediação é a família Lemnaceae. As Lemnáceas são uma família de pequenas plantas vasculares flutuantes que crescem rapidamente em condições favoráveis (Uysal e Taner, 2010).

A espécie *Lemna minor* (ou lentilha-de-água), utilizada no estudo realizado neste trabalho, pertence à família das Lemnaceae e é usada em estudos de qualidade da água para monitorizar a presença de metais e outros poluentes aquáticos (Radic *et al.*, 2011). A espécie *L. minor* em particular é utilizada em testes de toxicidade, estudos de remoção de nutrientes e metais (Brkanac *et al.*, 2010).

A lentilha-de-água possui propriedades fisiológicas que a tornam num bom modelo para ensaios ecotoxicológicos, designadamente o seu tamanho reduzido, elevadas taxas de

multiplicação e propagação vegetativa (Naumann *et al.*, 2007), facilidade de cultivo e manuseamento (Cayuela *et al.*, 2007), e sensibilidade a uma ampla gama de poluentes (Hillman, 1961; Wang e Williams, 1990; Christen e Theuer, 1996). Nos estudos realizados com *L. minor* os parâmetros mais comumente avaliados são o número de frondes e biomassa seca que permitem calcular taxas de crescimento (Greenberg *et al.*, 1992; Perreault *et al.*, 2010).

L. minor desenvolve-se em intervalos de temperatura entre os 5°C e 35°C apresentando ótimo crescimento entre os 20°C e 31°C e num amplo intervalo de pH (3.5-10.5) (Cayuela *et al.*, 2007) o que facilita a sua aplicação em condições ambientais diversificadas.

A literatura existente documenta claramente o uso da *Lemna spp* para a remoção de diversos poluentes em águas residuais, nomeadamente através da redução de matéria orgânica, remoção de nutrientes e remoção de poluentes metálicos (Megateli *et al.*, 2009; Khellaf *et al.*, 2010; Priya *et al.*, 2012). Estas plantas aquáticas são acumuladoras de diversos metais (Uysal e Taner, 2010; Bocuk *et al.*, 2013; Parlak e Yilmaz, 2013; Teixeira *et al.*, 2013; Varga *et al.*, 2013), e em particular as espécies *Lemna gibba* e *Lemna minor* têm demonstrado a capacidade de transformar por fitorremediação alguns poluentes orgânicos persistentes (Mkandawire e Dudel, 2007).

A utilização da *Lemna spp.* para melhorar especificamente a qualidade final das águas ruças não está bem documentada, havendo apenas algumas referências específicas que reportam a avaliação da toxicidade e a inibição de crescimento provocada por compostos fenólicos nesta espécie (Barber *et al.*, 1995; Cayuela *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2012). Tendo em consideração a capacidade da espécie em remover por fitorremediação poluentes orgânicos, este trabalho teve como objetivos testar a viabilidade de *L. minor* em águas ruças e avaliar a sua capacidade para melhorar a qualidade química destas águas residuais e delas remover compostos fenólicos. Foi igualmente ensaiado o fator tempo, para determinar o tempo ideal de contato da *L. minor* com as águas ruças para obter uma maior eficácia de tratamento.

2. Material e Métodos

2.1. Águas ruças

Para os ensaios de fitorremediação, foram utilizadas águas ruças recolhidas de um lagar de azeite localizado no concelho de Lamego, Portugal. O processo de produção de azeite deste lagar é de 2 fases, e as águas resultantes do processo produtivo (águas ruças) são apenas corrigidas quimicamente com cal e armazenadas em tanques de sedimentação, ao ar livre, até nova campanha de produção de azeite.

As amostras foram recolhidas em dois períodos distintos: um em outubro e novembro de 2012, sendo referente ao processo produtivo do ano de 2011 (figura 2) e, outro referente ao processo produtivo 2012/2013, recolhido em março de 2013. As amostras utilizadas em todos os ensaios com *L. minor* (10 L) foram conservadas a 4°C. A amostra de águas ruças do processo produtivo 2012/2013 foi utilizada no ensaio de longa duração e este efluente não estava corrigido quimicamente com cal, enquanto a amostra de 2011/2012 foi utilizada nos ensaios de viabilidade e ensaio final de 14 dias.



Figura 2 – Amostra de águas ruças recolhidas no lagar de azeite.

Uma sub-amostra filtrada, com filtros de fibra de vidro de 1,2 μ (GF/C 47 mm; Cat. no 1822-047 Whatman) deste efluente bruto foi congelada à chegada ao laboratório, para posterior caracterização físico-química e determinação de pH, cor, carência química de oxigénio (CQO) e índice fenólico.

O pH de cada réplica foi determinado pelo método potenciométrico usando um medidor portátil marca HANNA HI 991300 devidamente calibrado.

A CQO foi determinada pela adaptação do método aprovado pela EPA 410.4 (Environmental Protection Agency, 1993), em que a amostra é digerida na presença de

dicromato a 150 °C, durante 2 horas, com recurso aos kits de marca HANNA HI 93754B-25 Gama média (0 – 1500 mg/L), utilizando um digestor C9800 da HANNA Instruments. A leitura final da CQO foi realizada num fotómetro multiparamétrico C214 da mesma marca.

Para determinação do índice fenólico foi seguido o método fotométrico de fenóis, utilizando para o efeito o Kit da NanoColor Test 0-74 (0,2 – 5 mg/L), sendo a leitura posteriormente efetuada no fotómetro NanoColor 500D.

A cor foi determinada pelo método colorimétrico de platina-cobalto num fotómetro marca HANNA C200.

2.2. Ensaio de viabilidade

Os exemplares de *L. minor* utilizados no ensaio foram recolhidos no próprio dia dos respetivos ensaios numa estufa do Jardim Botânico do Porto, assim como a respetiva água do tanque onde se encontravam para ser usada como controlo.

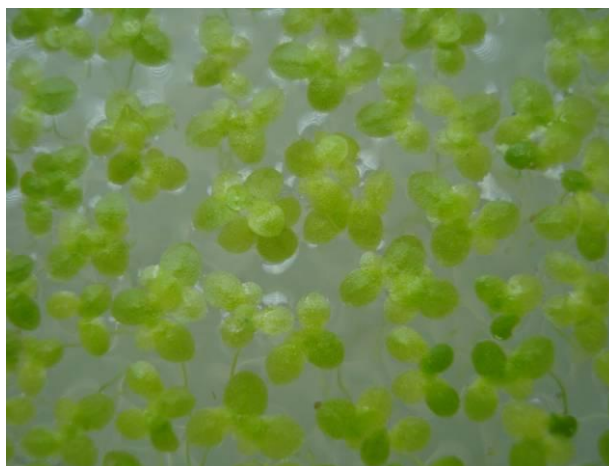


Figura 3 – Exemplares de *L. minor* utilizadas nos ensaios

Os ensaios foram realizados em erlenmeyers de 250 mL previamente esterilizados no auto-clave, a 120°C, 1 bar de pressão, durante 30 minutos. O desenho experimental deste primeiro ensaio está descrito na tabela 1.1, o qual incluiu os tempos de exposição 7, 14 e 21 dias, com três réplicas independentes para cada tempo de exposição. Em cada erlenmeyer adicionaram-se 50 mL de efluente filtrado (concentrado ou diluído com água do lago) ou do meio de controlo, de acordo com as concentrações descritas na tabela 1.1.

Tabela 1.1 – Desenho experimental do ensaio de viabilidade de *L. minor* no efluente de lagar de azeite.

Ensaio/meio	Nº réplicas	Tempo de exposição
Controlo/água do lago	9	7,14 e 21 dias
Efluente bruto	9	
100%/água ruça filtrada		
Efluente bruto	9	
75%/água ruça filtrada		
Efluente bruto	9	
50%/água ruça filtrada		
Efluente bruto	9	
25%/água ruça filtrada		

Para cada réplica, foi determinado o pH inicial, de acordo com a metodologia previamente descrita.

Em cada réplica foram colocadas aleatoriamente 60 frondes de *L. minor*, após determinação do seu peso fresco inicial. Para o efeito as lentilhas-de-água foram secas em papel absorvente para retirar o excesso de água, e posteriormente pesadas em balança de precisão (0,001g).

Do pool inicial de *L. minor* recolhidas foram retirados 3 grupos de 60 frondes, secas em papel absorvente e determinado o peso fresco. Posteriormente, foram colocadas a secar na estufa a 70°C, de um dia para o outro (mínimo 12h) para depois determinar peso seco. Esta determinação permite fazer uma estimativa da biomassa seca inicial a partir da biomassa fresca que foi usada nas réplicas.

Na tabela 1.2 são apresentados os valores iniciais do número de frondes, colónias, peso fresco e pH inicial das réplicas para os ensaios de 7, 14 e 21 dias.

Tabela 1.2 – Nº de frondes, colónias, peso fresco das frondes e pH das réplicas para ensaios de 7, 14 e 21 dias.

Concentração	Réplica	Nº de frondes	Nº de colónias	Peso fresco (g)	pH
Controlo	(7d) R1,R2,R3	61,61,60	18,19,19	0,023; 0,024; 0,023	6,33
	(14d) R1,R2,R3	60,60,60	17,17,17	0,022;0,024;0,019	6,55
	(21d) R1,R2,R3	62,60,60	18,16,19	0,027;0,025;0,026	6,95
100% E. B.	(7d) R1,R2,R3	61,61,61	18,17,18	0,023; 0,027; 0,021	7,25
	(14d) R1,R2,R3	60,60,61	18,17,17	0,024;0,021;0,024	7,33
	(21d) R1,R2,R3	60,60,60	18,17,18	0,025;0,029;0,028	7,58
75% E. B.	(7d) R1,R2,R3	60,60,60	16,17,17	0,024;0,028; 0,025	7,28
	(14d) R1,R2,R3	60,60,60	17,18,18	0,026;0,023;0,019	7,39
	(21d) R1,R2,R3	61,60,61	18,16,16	0,026;0,025;0,03	7,47
50% E. B.	(7d) R1,R2,R3	60,61,60	18,17,17	0,020;0,022; 0,021	7,12
	(14d) R1,R2,R3	60,60,60	17,17,16	0,018;0,025;0,022	7,26
	(21d) R1,R2,R3	61,60,60	19,18,21	0,022;0,027;0,026	7,3
25% E. B.	(7d) R1,R2,R3	61,60,61	20,18,18	0,022;0,024;0,022	6,78
	(14d) R1,R2,R3	60,60,60	18,17,16	0,029;0,034;0,020	7,13
	(21d) R1,R2,R3	60,61,61	22,19,18	0,038;0,024;0,025	7,1

Os ensaios decorreram numa câmara com temperatura, intensidade luminosa e fotoperíodo constantes (20 ± 2 °C, ≈ 7000 lux, e 16h luz: 8h escuro, respetivamente). Os erlenmeyers foram parcialmente cobertos com parafilme perfurado de modo a permitir as trocas gasosas. No final de cada ensaio determinou-se o peso fresco e peso seco (após secagem em estufa a 70°C no mínimo durante 12 horas). Foram registadas as alterações no aspeto visual e cor das frondes e determinou-se o valor de pH final para cada réplica.

Os efluentes finais dos ensaios foram armazenados em tubos e congelados para posterior determinação da cor, CQO e índice fenólico, de acordo com a metodologia previamente descrita.

2.3. Ensaio Final de 14 dias com *L. minor*

O ensaio de 14 dias foi repetido, para confirmação da pigmentação que surgiu nas frondes de *L. minor*, no ensaio anteriormente descrito. Para o efeito foi utilizado o efluente bruto original que se manteve refrigerado, com novos exemplares de *L. minor* recolhidos na mesma estufa do Jardim Botânico. As concentrações testadas foram as mesmas assim como as condições da câmara. O material utilizado foi preparado nas mesmas condições do ensaio preliminar. Para a determinação do peso fresco inicial e peso seco foi utilizada uma balança de precisão (0,0001g).

Na tabela 1.3 estão descritos os dados, para o número de frondes, colónias, peso fresco e pH inicial de cada réplica, registados no início do ensaio de 14 dias.

Tabela 1.3 – Nº de frondes, colónias, peso fresco das frondes e pH das réplicas do ensaio final de 14 dias.

Concentração	Réplica	Nº de frondes	Nº de colónias	Peso fresco (g)	pH
Controlo	R1,R2,R3	60,61,60	17,16,15	0,0244;0,0275;0,0236	8,33
100% E. B.	R1,R2,R3	60,61,61	16,15,17	0,0274;0,0274;0,0226	6,77
75% E. B.	R1,R2,R3	60,60,61	15,16,15	0,0284;0,0218;0,0262	6,85
50% E. B.	R1,R2,R3	61,61,60	16,18,18	0,0263;0,026;0,0275	6,96
25% E. B.	R1,R2,R3	60,61,60	15,15,15	0,0252;0,0295;0,0237	7,20

No final do ensaio foram registadas as alterações de cor, aspeto visual e peso fresco de *L. minor* para cada réplica e determinou-se o pH final. Os efluentes finais do ensaio foram armazenados em tubos e congelados para posterior determinação da CQO e índice

fenólico segundo métodos descritos anteriormente. Foi feito o registo fotográfico de *L. minor* para uma réplica de cada concentração utilizando uma lupa binocular (Leica MZ 75) e um *software* de fotografia de imagem também da Leica.

2.4. Ensaio de longa duração com *L. minor*

Com base nos resultados obtidos nos ensaios anteriores realizou-se um ensaio de longa duração onde se manteve o efluente bruto e com a periodicidade de 7 dias renovaram-se as frondes de *L. minor*. Este ensaio teve como objetivo avaliar se ocorreria uma melhoria na qualidade final do efluente, com a renovação da biomassa atuante.

Foi utilizado neste ensaio efluente bruto proveniente do mesmo lagar de azeite mas da campanha de produção 2012/2013 e que ainda não tinha sofrido ajuste de pH. Uma sub-amostra deste efluente bruto foi filtrada, em filtro de fibra de vidro de 1,2 μ (GF/C 47 mm; Cat. no 1822-047 Whatman) para determinação de pH, cor, CQO e índice fenólico e a restante foi conservada a 4°C para utilização no ensaio.

As frondes de *L. minor* utilizadas no ensaio foram recolhidas na estufa do Jardim Botânico no mesmo dia em que foi iniciado o ensaio.

Tendo por base os resultados dos ensaios anteriores, em que se observou que os exemplares de *L. minor* tinham a capacidade de se manter no efluente de lagar de azeite, durante pelo menos três semanas, apenas foi testada a concentração de 100% de efluente (Tabela 1.4). Consideraram-se 3 réplicas para o controlo e 6 réplicas para a concentração de 100% de efluente, mas com a diferença de que o controlo neste ensaio foi o próprio efluente bruto sem a planta, pois o que se pretendia era verificar de que modo *L. minor* contribuía para a melhoria das propriedades do efluente. Nas réplicas com 100% de efluente colocaram-se 60 frondes de *L. minor* seleccionadas aleatoriamente. Neste tratamento (R4, R5 e R6) não houve renovação da biomassa vegetal para avaliar o tempo máximo de viabilidade da planta no efluente.

No tratamento com renovação (R7, R8 e R9), as frondes de *L. minor* foram substituídas ao fim de cada 7 dias, determinando-se no início e no final deste período o peso fresco e seco das mesmas conforme descrito no ensaio preliminar numa balança de precisão (0,0001g). No tratamento sem renovação, foi seguido o mesmo procedimento para determinação do peso fresco e seco, mas apenas no início e final do ensaio.

O ensaio decorreu em copos de vidro de 250 mL, tapados com papel transparente furado, e colocados à luz e fotoperíodo natural e à temperatura ambiente do laboratório.

Mediu-se o pH em todas as réplicas no início, e durante o ensaio até conclusão do mesmo com o medidor portátil HANNA HI 991300.

A determinação dos parâmetros cor, CQO e índice fenólico foi realizada utilizando os mesmos métodos dos ensaios preliminares já descritos.

As condições iniciais do ensaio estão registadas na tabela 1.4.

Tabela 1.4 – Condições iniciais do ensaio de longa duração: pH, nº de frondes e peso fresco das frondes.

Concentração	Réplica	Nº de frondes	Peso fresco (g)	pH
Controlo	R1	-	-	4,3
	R2	-	-	
	R3	-	-	
100% E. B. *	R4	60	0,0336	4,3
	R5	60	0,0225	
	R6	61	0,0372	
100% E. B.	R7	60	0,0280	4,3
	R8	60	0,0291	
	R9	61	0,0361	

* sem substituição de *L. minor*

No final de 7 dias, face aos resultados obtidos, houve necessidade de repetir o ensaio, pois constatou-se um aumento do pH quer nos controlos quer nas réplicas com *L. minor*. Os exemplares de *L. minor* tinham cor escura e não apresentavam atividade. Este primeiro ensaio prosseguiu, tendo sido feita a substituição da biomassa tal como acima descrito em todas as réplicas, e tendo-se começado a contar o tempo zero a partir desse momento. Nesta altura não se procedeu a nenhum ajuste do pH, porque o mesmo já havia ocorrido espontaneamente nos primeiros 7 dias de ensaio (vide secção de resultados). Mas em paralelo, foi iniciado um novo ensaio para o qual foram preparados os mesmos tratamentos seguindo o procedimento acima descrito, mas desta vez com o pH do efluente bruto corrigido para valores superiores a 6, tendo por base o pH do efluente utilizado nos ensaios de viabilidade. Para ambos os ensaios optou-se também por colocá-los a decorrer na câmara com ambiente controlado (temperatura e fotoperíodo) tal como descrito nos ensaios anteriores. O ensaio prolongou-se durante 28 dias, tendo sido monitorizado o pH para todas as réplicas.

Em ambos os ensaios, sem correção de pH e com correção de pH, os valores de peso fresco e seco foram determinados numa balança de precisão (0,0001g).

Optou-se por terminar o ensaio para o caso das réplicas R4, R5 e R6 ao fim de 28 dias de ambos os ensaios, tendo sido congelados as amostras para posterior determinação da cor, CQO e índice fenólico (métodos descritos nos ensaios anteriores).

Para as réplicas R7, R8 e R9 dos 2 ensaios (sem correção e com correção de pH), ao fim dos 28 dias colocaram-se aleatoriamente mais frondes nos copos de modo a cobrir a totalidade da superfície do efluente. As réplicas R1, R2 e R3 do controlo de ambos os ensaios mantiveram-se nas mesmas condições. O ensaio manteve-se na câmara e ao fim de mais 14 dias retiraram-se as lentilhas-de-água, mediu-se o pH das réplicas e voltaram-se a colocar novos exemplares a cobrir o efluente. Estas últimas *L. minor* foram retiradas ao fim do mesmo tempo das anteriores, determinada a cor do efluente e seguidamente congeladas as amostras para determinação de CQO e índice fenólico, segundo métodos anteriormente descritos no ensaio preliminar. A determinação de CQO e índice fenólico foi feita para amostras compostas (resultantes da mistura das 3 réplicas) dos diferentes tratamentos (controlo, 100% EB sem renovação de *L. minor* e 100% de E. B. com renovação de *L. minor*) para os dois ensaios. O objetivo desta etapa do ensaio foi testar a capacidade de depuração do efluente independentemente da capacidade de crescimento da *L. minor*, pelo que não foi avaliada a biomassa final produzida.

Ambos os ensaios tiveram uma duração total de 60 dias.

2.5. Análise química do efluente

As amostras de águas ruças (40 mL por repetição) foram submetidas à extração líquido-líquido: 40 mL de amostra e 25 mL de éter dietílico foram transferidos e misturados num funil de separação. A camada superior foi recolhida por aspiração. A extração foi repetida duas vezes com 25 mL de éter dietílico e 25 mL de acetato de etilo, respetivamente. Todos os extratos orgânicos foram filtrados através de sulfato de sódio, recolhidos num balão 100 mL em forma de pêra e colocados num evaporador rotativo, a 45 °C, até atingir um volume de 0,5 mL, e mantidos sob azoto gasoso até secar. As amostras secas foram redissolvidas com 3 mL de éter dietílico e transferidas para um microtubo. Às amostras resultantes adicionaram-se 250 mL de piridina (Fluka, Espanha), 250 µL de bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (Fluka, Espanha), e 50 µL de

clorotrimetilsilano (Sigma-Aldrich, Alemanha) e, mantendo-se de seguida a mistura num banho de areia (70 °C, 30 min).

Para a quantificação dos compostos orgânicos os extratos de amostras foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS num Shimadzu QP5000), usando uma coluna capilar (SPB-5, 30 m x 0,32 mm, 0,25 mm de espessura de filme, Supelco, Espanha) (Justino *et al.*, 2009; Duarte *et al.*, 2012). O GC-MS foi operado em modo de monitorização seletiva de iões. O injetor foi mantido a uma temperatura de 250 °C e usou-se o seguinte programa de temperaturas: de 80 °C a 220 °C com uma velocidade de 3 °C minuto⁻¹, seguido de 220 °C a 290 °C com uma velocidade de 6 °C minuto⁻¹, permanecendo a 290 °C durante 3,09 minutos. O gás de arraste utilizado foi o hélio, com o seguinte programa de pressões: pressão inicial de 50 kPa durante 1 min, seguido de 90 kPa (1,5 kPa 1 minuto) e em seguida a 110 kPa (0,7 kPa, 1 minuto). A concentração de cada composto foi determinada por interpolação direta nas curvas de calibração dentro da sua gama de resposta linear, e os limites de deteção foram calculados utilizando a fórmula: $y = y_B + 3s_B$, onde s_B é o desvio padrão do sinal do branco estimado como $S_{Y/X}$, o desvio padrão residual é retirado a partir da linha de calibração, e y_B é o sinal do branco estimado a partir da interceção (Miller e Miller, 2005).

2.6. Análise estatística

a) Ensaio de viabilidade

De forma a comparar os parâmetros de crescimento de *L. minor* (número de frondes, número de colónias, peso fresco e peso seco), entre tratamentos (concentração do efluente) e tempo de exposição das lentilhas-de-água ao efluente foi efetuada uma análise de variância de duas vias (*do inglês; two-way-ANOVA*). Esta análise permitiu ainda verificar a significância da interação entre os fatores tempo de exposição (7, 14 e 21 dias) e tratamentos (CTL, EB25%, EB50%, EB75, EB100%). Posteriormente realizaram-se análises de variância de uma via (*do inglês; one-way-ANOVA*), para testar o efeito do fator tempo de exposição para cada nível do fator tratamento, e o efeito do fator tratamento para cada nível do tempo de exposição. No primeiro caso a análise de variância de uma via foi seguida do teste de Dunnett para identificar as diferenças relativamente ao controlo, nos parâmetros acima mencionados. No segundo caso realizaram-se testes de comparações múltiplas de Tukey HSD (Zar, 2010), para analisar diferenças entre tempos de exposição. Uma vez que na análise de variância de duas vias, se registou uma interação significativa entre os dois fatores, as análises de

variâncias de uma via, acima mencionadas, foram realizadas com correção do valor de F, substituindo o valor de MS do erro, pelo mesmo valor obtido na análise de variância de duas vias (Quinn e Keoug, 2002).

Os parâmetros referentes à qualidade química do efluente (pH, cor e índice fenólico) foram analisados por análises de variância de uma via, para verificar o efeito do fator tempo, em cada um dos tratamentos efetuados. O CTL foi retirado desta análise por se tratar de água do tanque do jardim. Sempre que se registaram diferenças significativas, efetuou-se um teste Tukey HSD de comparações múltiplas para identificar as diferenças entre os tempos de exposição.

b) Ensaio de longa duração

Nos ensaios de longa duração, com e sem ajuste de pH, os dados de peso seco e número de frondes das plantas foram analisados através de análises de variância de uma via, de modo a detetar diferenças de crescimento entre os grupos de plantas removidos a cada sete dias dos ensaio, assim como entre os valores iniciais e os valores finais destes parâmetros, nas réplicas sem renovação. Sempre que se registaram diferenças significativas realizaram-se testes de comparações múltiplas Tukey HSD, para identificar as diferenças específicas entre os grupos.

Antes da realização das análises de variância e de uma e duas vias o cumprimento do pressuposto da homogeneidade de variâncias foi analisado com recurso ao teste de Levene.

Para a análise estatística foi utilizado o *software Stastistica StatSoft* - versão 11.

3. Resultados e Discussão

3.1. Caraterização do efluente bruto

Nas tabelas 1.5 e 1.6 são apresentados os resultados obtidos na caraterização química do efluente bruto filtrado usado nos ensaios de viabilidade de 7, 14 e 21 dias e ensaio final de 14 dias.

Tabela 1.5 – Caracterização química das águas ruças dos ensaios de viabilidade de 7,14 e 21 dias e ensaio final de 14 dias.

Parâmetros	Média (µg/L)
Ácido mirístico	32,3 ± 0,86
Ácido palmítico	98,0 ± 0,40
Ácido linoleico	112,3 ± 0,4
Ácido oleico	326,7 ± 0,85
Ácido esteárico	40,4 ± 0,25
Ácido α-linolenico	23,5 ± 0,40
Ácido lignocérico	27,5 ± 0,35
β-sitosterol	40,5 ± 0,2
Catecol	73,5 ± 0,40
Tirosol	80,4 ± 0,26
Ácido vanílico	23,7 ± 0,25
Ácido p-cumárico	71,6 ± 0,21
Ácido cafeico	85,4 ± 0,3

Os valores médios obtidos para os compostos orgânicos das águas ruças utilizadas no ensaio, são da mesma ordem de grandeza dos obtidos e descritos pela literatura existente, em casos em que da mesma forma ocorreu armazenamento em tanques das águas ruças sem diluição (Duarte *et al.*, 2012) e muito superiores em comparação ao efluente que embora tenha sido armazenado em tanques foi sujeito a diluição (Justino *et al.*, 2009). A toxicidade das águas ruças deve-se segundo diversos autores (Greca *et al.*, 2001; Fiorentino *et al.*, 2003; Isidori *et al.*, 2005) à presença de compostos fenólicos como (o tirosol, o ácido cumárico, o ácido vanílico e o ácido cafeico), compostos estes que estão presentes no efluente testado neste trabalho. Estes compostos fenólicos presentes nas águas ruças interferem em diversos processos fisiológicos tais como no crescimento e desenvolvimento das plantas e têm um efeito fitotóxico na fisiologia das mesmas (Garcia-Sanchez *et al.*, 2012).

Tabela 1.6 – Caracterização química das águas ruças dos ensaios de viabilidade de 7,14 e 21 dias e ensaio final de 14 dias.

Parâmetros / unidades	
pH	6,18
Cor ^a (Pt-Co)	2637
CQO ^a (mg/L)	672
Índice fenólico ^a (mg/L)	4,8

^a amostra filtrada e congelada

O valor de pH obtido é ligeiramente superior aos valores encontrados na bibliografia, que se caracterizam normalmente por valores de pH inferiores a 6 (Justino *et al.*, 2012). Os níveis de CQO e índice fenólico deste efluente foram igualmente inferiores aos documentados (Duarte *et al.*, 2012; Justino *et al.*, 2012), supõem-se que isto resulte do facto dos mesmos terem sido determinados após a filtração do efluente bruto. Os valores de cor descritos na bibliografia foram determinados por método diferente do realizado neste trabalho, não permitindo uma comparação direta (Khoufi *et al.*, 2007; Amaral *et al.*, 2012).

Na tabela 1.7 é apresentado o valor médio de biomassa seca estimado para o número de frondes adicionadas inicialmente em todas as réplicas do ensaio.

Tabela 1.7- Valor obtido de biomassa inicial de *L. minor*.

Biomassa inicial (mg)	
Média	1,3 ± 0,25

3.2. Ensaio de viabilidade de *L. minor*

No final dos primeiros 7 dias de ensaio, *L. minor* apresentava-se de uma forma geral bem desenvolvida quer no controlo quer nas diferentes concentrações testadas, tendo ocorrido um aumento médio de biomassa seca de $4.6 \pm 0,32$ vezes em todos os tratamentos após este período.

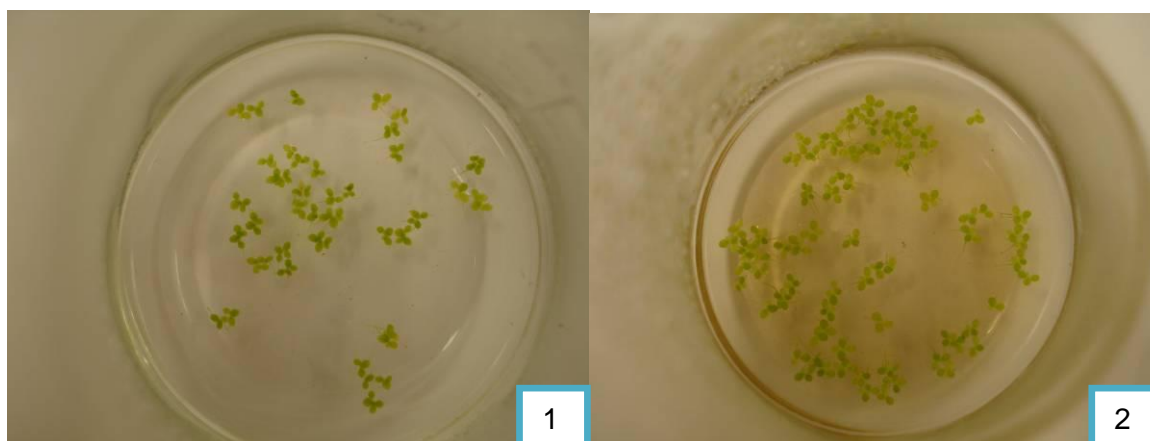


Figura 4 – Foto do controlo (1) e ensaio com 25% de efluente de lagar de azeite (2).

Na concentração de 50% de efluente bruto *L. minor* apresentava frondes e raiz bem desenvolvidas. A cor verde manteve-se embora com intensidade inferior conforme figura 5.



Figura 5 – Foto 1 e 2 do ensaio com 50% de efluente de lagar de azeite.

Para as concentrações de efluente de 75% e 100%, *L. minor* apresentava frondes e raízes bem desenvolvidas embora em menor número. Algumas das frondes surgiram com uma cor amarela e as raízes apresentam uma cor castanha escura sugerindo a adsorção de alguns compostos na superfície da epiderme das raízes e talvez a possível incorporação de produtos conjugados nas paredes celulares e vacúolos das raízes das plantas (Sandermann, 1994; Coleman *et al.*, 1997; McCutcheon e Schnoor, 2003), a ocorrer nas diluições menores do efluente (Figuras 6 e 7). A degradação da cor das frondes, poderá ter resultado do stress oxidativo provocado pelas águas ruças, que constituídas por compostos fenólicos aumentam a produção de espécies reativas de oxigénio (Bais *et al.*, 2003; Cruz-Ortega *et al.*, 2007). Estas espécies oxidativas de oxigénio têm o potencial de danificar os cloroplastos pela reação com biomoléculas tais como ácidos nucleicos, proteínas e lípidos (Mittler *et al.*, 2004).

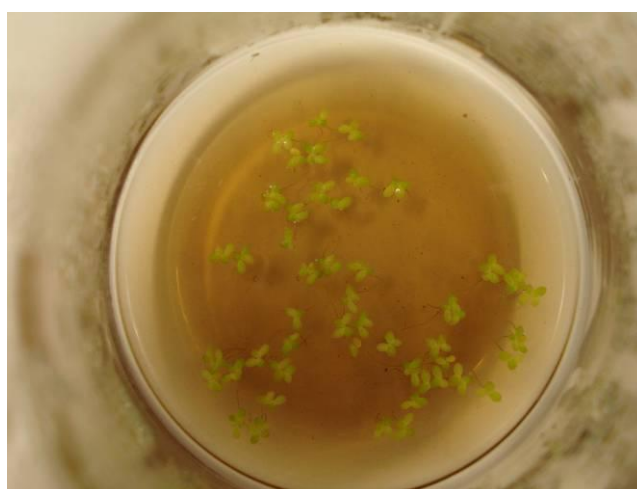


Figura 6 – Aspeto final de *L. minor* com 75% efluente de lagar de azeite.



Figura 7 – Aspeto final de *L. minor* com 100% efluente de lagar de azeite.

Ao fim de 14 dias registaram-se algumas diferenças relativamente às réplicas de 7 dias exposição. No caso das réplicas do controlo, o meio apresentava um depósito de cor verde, possivelmente devido ao crescimento de algas uma vez que a água do meio não foi esterilizada, e um menor número de frondes. (Figura 8).



Figura 8 – Foto do controlo para o ensaio de 14 dias.

Para a concentração de 25% de efluente bruto, a cor das frondes era amarela esverdeada e o efluente apresentava depósito e cor amarela. De qualquer modo registou-se um maior desenvolvimento de frondes (Figuras 51 e 52 do Anexo I).

Na concentração de 50% de efluente bruto, *L. minor* apresentou-se bem desenvolvida e com elevado número de frondes (Figura 9). Na página inferior das frondes de *L. minor* surgiu uma pigmentação de cor preta (Figura 10) em praticamente todas as réplicas e ocorreu a redução de cor na fase aquosa com formação de um depósito no fundo dos frascos (Figura 9).

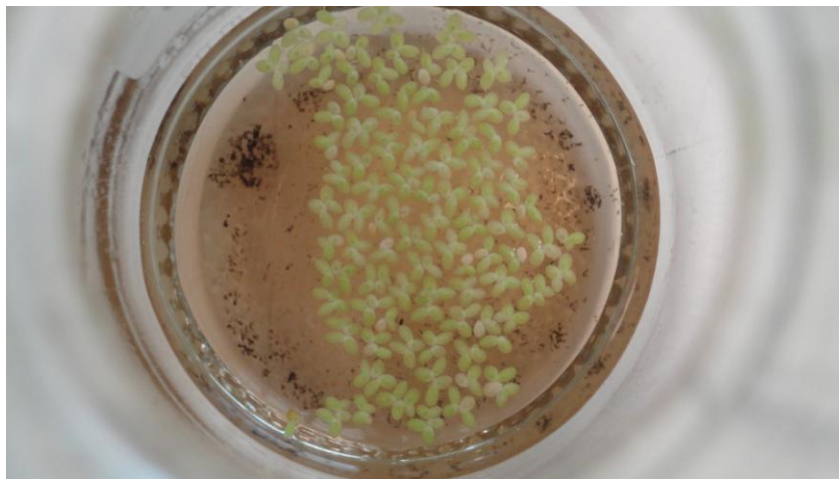


Figura 9 – Foto da réplica do ensaio de 14 dias com concentração de 50% de efluente bruto.



Figura 10 – Foto da pigmentação de *L. minor* no ensaio de 14 dias com concentração de 50% de efluente bruto.

Na concentração de 75% de efluente bruto também ocorreu redução de cor na fase aquosa aumentando a quantidade de depósito de cor escura. As frondes estavam bem desenvolvidas e em número elevado. A sua cor era menos intensa e mais amarela e a pigmentação preta na parte inferior das frondes também existia. Era visível igualmente em algumas raízes de *L. minor* uma acumulação de matéria orgânica particulada nas raízes, semelhante à que existia no fundo do recipiente (Figuras 11 e 12).

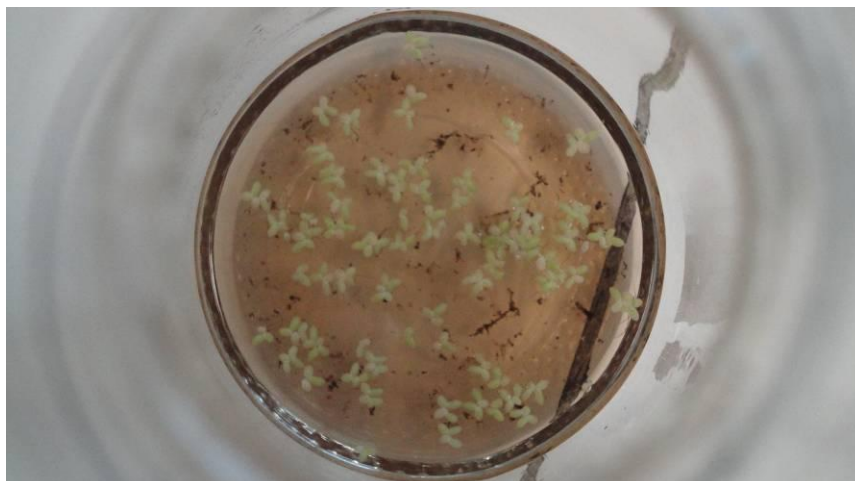


Figura 11 – Foto do ensaio de 14 dias com concentração de 75% de efluente bruto.



Figura 12 – Fotos da pigmentação de *L. minor* no ensaio de 14 dias com concentração de 75% de efluente bruto.

Nas réplicas com efluente bruto não diluído registou-se uma variabilidade maior no seu aspeto visual (Figuras 53 e 54 do Anexo I). No caso das réplicas 1 e 2 as frondes estavam desenvolvidas e eram numerosas. Apresentavam depósito acumulado no fundo do recipiente, pigmentação preta nas frondes e adsorção de compostos à superfície das raízes. No caso da réplica 3 a cor do efluente tornou-se amarela, com algum depósito e *L. minor* desenvolveu-se em maior número de colónias do que frondes. A cor das frondes era verde esbranquiçada, e a pigmentação não era tão evidente.

Nas réplicas expostas ao efluente de 21 dias, as frondes de *L. minor* estavam desenvolvidas embora se evidenciasse perda de cor em algumas. Houve também uma ligeira formação de depósito nas réplicas do controlo conforme representado no Anexo I (Figura 55), e que ocorreu também nas réplicas de 14 dias de exposição.

Na concentração de 25% de águas ruças, ao fim de 21 dias, embora tenha ocorrido um maior desenvolvimento de *L. minor* a cor verde das frondes não era muito intensa e algumas estavam amarelas ou até mesmo brancas. Também surgiram alguns exemplares com pigmentação preta assim como se registou formação de depósito verde-amarelo no efluente, certamente resultante neste caso de frondes em decaimento (Figura 13).



Figura 13 – Foto 1 e 2 de *L. minor* no ensaio de viabilidade de 21 dias com 25% de efluente bruto.

No final da exposição nas réplicas com 50% de efluente bruto as plantas apresentavam elevado número de frondes, mas a sua cor verde estava igualmente pouco intensa. Tornaram-se amarelas com pigmentos pretos e o efluente apresentou um depósito branco (Figuras 56 em Anexo I). Para a concentração de 75% de efluente bruto, as frondes ainda que em número elevado, apresentaram-se de uma forma geral amarelas ou brancas com pigmentação. A pigmentação escura era menos evidente do que na

concentração de 50% do efluente bruto e apenas surgiu numa das réplicas (Figura 14). Houve formação de depósito branco nos recipientes.

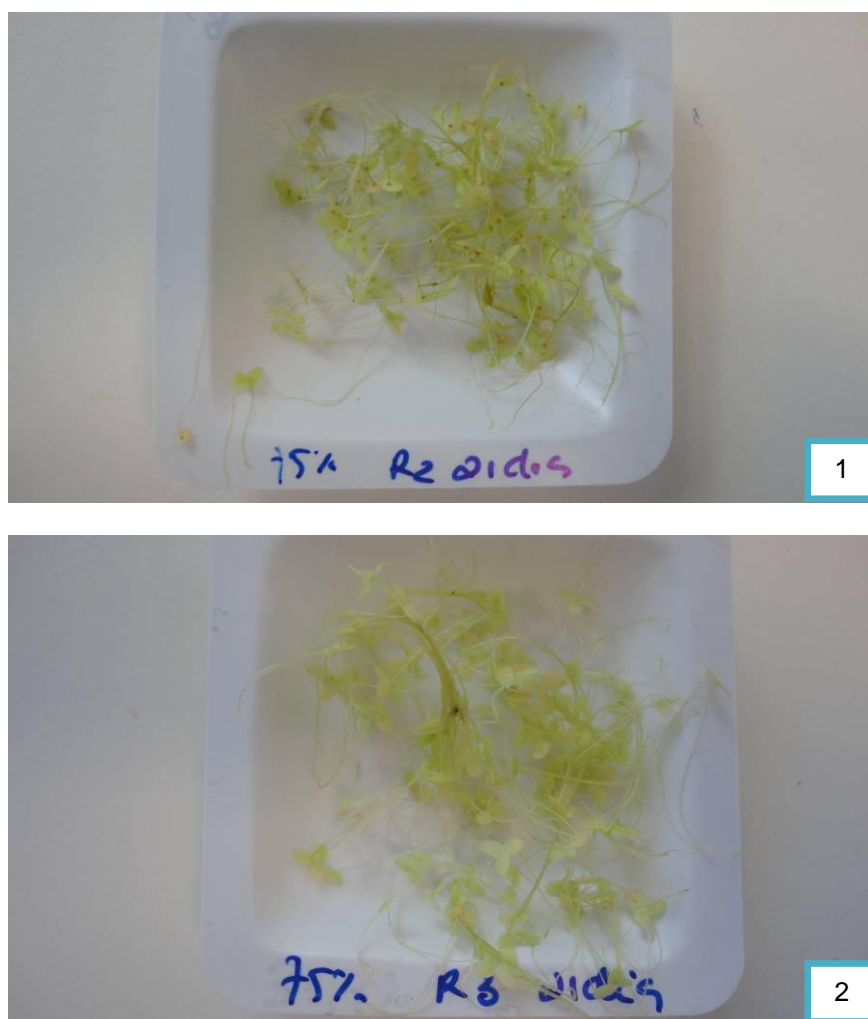


Figura 14 – Fotos 1 e 2 de *L. minor* no ensaio de viabilidade de 21 dias com 75% de efluente bruto.

No final do ensaio com 100% de efluente bruto as frondes de *L. minor* nas réplicas R1 e R2 surgiram com pouca coloração verde, sem pigmentação preta e o efluente tinha depósito preto. No caso da réplica R3 o depósito era escuro e as frondes apresentavam uma ligeira pigmentação (Figura 57 em Anexo I).

O processo de clorose (perda de pigmentação verde nas frondes) que ocorreu de uma forma geral para todas as concentrações deste ensaio é um sintoma reconhecido de toxicidade nas frondes expostas a substâncias poluentes (Khellaf e Zerdaoui, 2009). Da mesma forma que a ocorrência da pigmentação escura em *L. minor* poderá ter resultado da excreção após acumulação de compostos orgânicos existentes nas águas ruças (Megateli *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2012; Uysal e Taner, 2010). Outra explicação possível para a perda de pigmentação verde e de pigmentação castanha pode residir nos efeitos

que as águas ruças parecem ter quer no processo fotossintético, quer através da degradação de pigmentos, da inibição da sua biossíntese, ou por alterações no funcionamento do PSII. Estes efeitos foram observados por Asfi *et al.* (2012) em *Spinacea oleracea* L. irrigada durante um mês com duas diluições de águas ruças 1:10 e 1:20, em paralelo com a bioacumulação de compostos polifenólicos. Em suma, perda de cor verificada nas frondes pode ter resultado do processo de clorose e consequentemente da redução do conteúdo total de clorofilas e carotenoides como reposta à presença de compostos tóxicos (Khellaf e Zerdaoui, 2010).

Nas figuras 15 a 18, estão representadas as variações dos parâmetros de crescimento de *L. minor* registados nos diferentes tratamentos e tempos de exposição. A análise de variância de duas vias revelou sempre a ocorrência de diferenças altamente significativas entre tratamentos e tempos de exposição, assim como interações significativas entre os dois fatores, para os parâmetros: número de frondes (Tratamento: $F=61,40$; d.f. 4, 3; $p<0,001$; Tempo: $F=47,146$, d.f. 2, 30; $p<0,001$; Tratamento X Tempo: $F=9,12$; d.f. 8, 30; $p<0,001$); número de colónias (Tratamento: 54,53; d.f. 4, 30; $p<0,001$; Tempo: 34,69; d.f. 2, 30; $p<0,001$; Tratamento X Tempo: $F=5,43$; d.f. 8, 30; $p<0,001$); peso fresco (Tratamento: $F=34,77$; d.f. 4, 30; $p<0,001$) e peso seco (Tratamento: $F=19,20$; d.f. 4, 30; $p<0,001$; Tempo: $F=207,24$; d.f. 2, 30; $p<0,001$; Tratamento X Tempo: $F=14,38$; d.f. 8, 30; $p<0,001$). Como é possível observar nas figuras 15 a 18, à medida que a concentração do efluente aumenta os valores médios para os parâmetros acima mencionados tendem a diminuir para concentrações acima de 50% de efluente, sendo os valores máximos atingidos nesta concentração ou na concentração de 25%. Os valores médios destes parâmetros foram sempre inferiores no controlo com água do tanque. Nas concentrações mais altas, estes resultados eram de prever uma vez que as águas ruças são constituídas por compostos fenólicos, que são substâncias inibidoras das atividades enzimáticas e causam alterações nos processos metabólicos necessários no funcionamento normal das células das plantas (Garcia-Sánchez *et al.*, 2012). Sendo a diluição maior, este efeito negativo terá sido ultrapassado pelo efeito benéfico do fornecimento de nutrientes por parte do efluente. Os valores mas baixos para o controlo podem assim ter resultado do esgotamento dos nutrientes, uma vez que não houve reforço dos mesmos durante o tempo de ensaio, pois a água não foi renovada. Além do mais, parece ter ocorrido o desenvolvimento, ainda que ténue, de algas nos copos do controlo, as quais terão igualmente competido pelos nutrientes. A escassez de nutrientes

da água utilizada no controlo, e o seu efeito no crescimento de *L. minor*, foi também confirmada por Teixeira *et al.* (2013).

Nas figuras 15 a 18, é possível verificar ainda que de uma forma geral o número de frondes e de colónias assim como o peso fresco e o peso seco de *L. minor* aumentou ao longo do tempo de exposição atingindo os valores mais elevados ao fim de 21 dias de exposição. Nas concentrações mais elevadas do efluente (75% e sobretudo 100%) isto acontece ao fim de 14 dias, não havendo grandes variações com mais 7 dias de exposição das plantas. Os efeitos das águas ruças na produção de biomassa fresca e seca de plantas foram já reportados por Asfi *et al.* (2013) e outros autores por ele citados, quer para espécies diferentes, quer para diluições elevadas deste efluente. Estas observações levam assim a crer que 7 a 14 dias será o tempo ideal de exposição de *L. minor* ao efluente não diluído, para que as plantas se mantenham viáveis e ativas. Contudo, *L. minor* demonstrou ser mais tolerante à toxicidade das águas ruças de processos de extração de duas fases do que *L. gibba*. As plantas desta última espécie morreram 7 dias após a exposição a este efluente diluído numa proporção de 1:10 (Cayuela *et al.*, 2007). Contudo, como as amostras testadas apresentavam valores de pH entre 5 e 5,5, e as exposições foram feitas sem ajuste de pH, torna-se difícil de perceber se a mortalidade terá sido causada pelo pH, se por outros compostos tóxicos do efluente. As razões para esta dúvida estão suportadas pelos resultados do ensaio de longa duração realizado e que são reportados mais à frente.

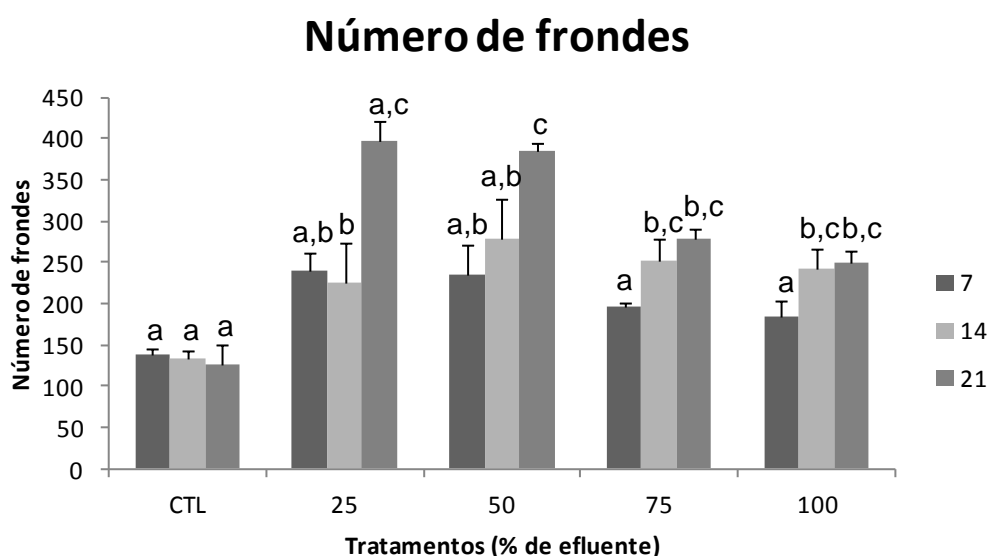


Figura 15. Variação do número médio de frondes de *L. minor* entre tratamentos e tempo de exposição. As barras de erro representam o desvio padrão e as letras a, b e c, representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre tempos para cada um dos tratamentos, segundo o teste de Tukey HSD de comparações múltiplas.

Número de colónias

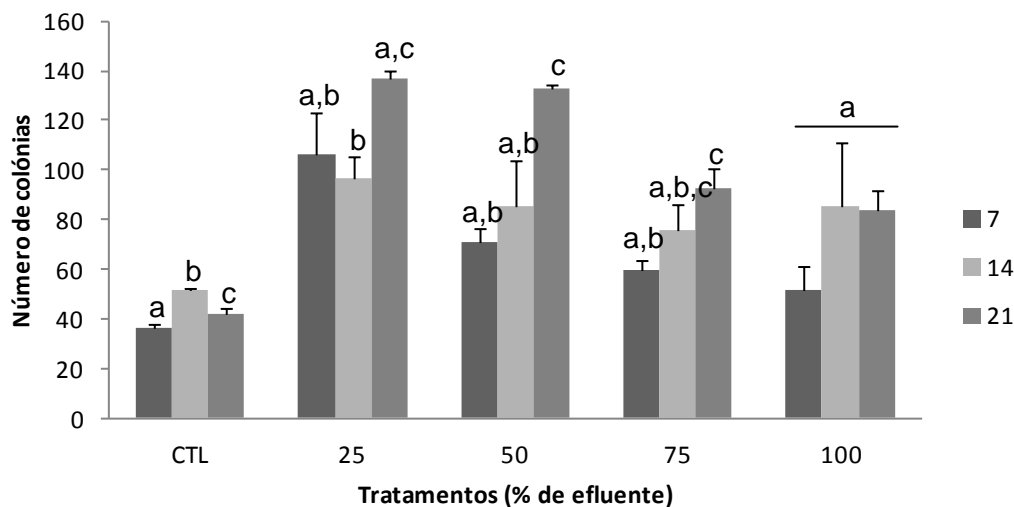


Figura 16. Variação do número médio de colónias de *L. minor* entre tratamentos e tempo de exposição. As barras de erro representam o desvio padrão e as letras a, b e c, representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre tempos para cada um dos tratamentos, segundo o teste de Tukey HSD de comparações múltiplas.

Peso fresco

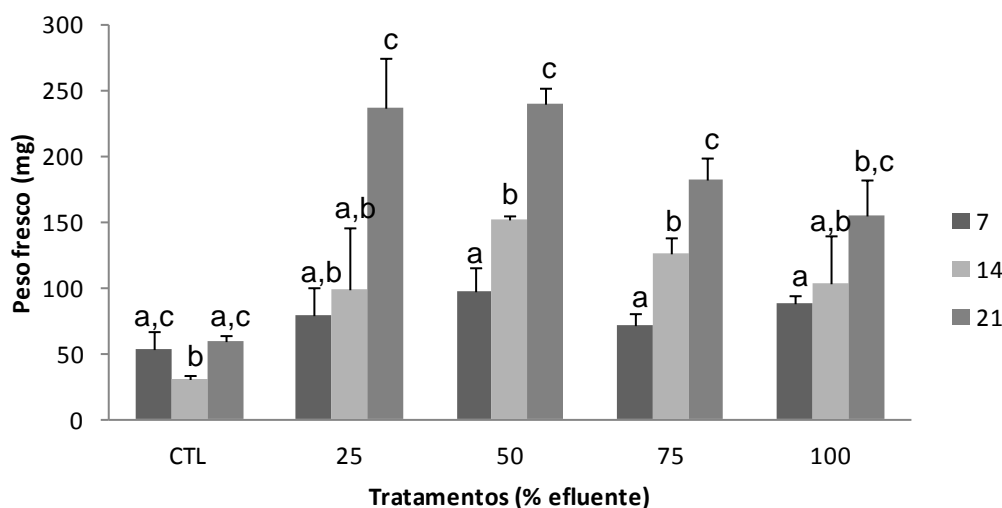


Figura 17. Variação do peso fresco médio de *L. minor* entre tratamentos e tempo de exposição. As barras de erro representam o desvio padrão e as letras a, b e c, representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre tempos para cada um dos tratamentos, segundo o teste de Tukey HSD de comparações múltiplas.

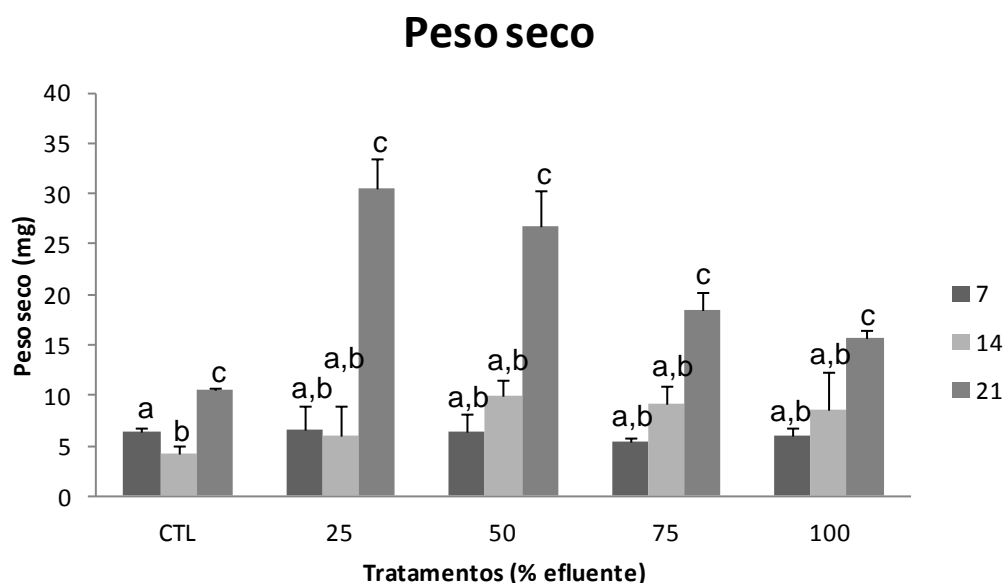


Figura 18. Variação do peso seco médio de *L. minor* entre tratamentos e tempo de exposição. As barras de erro representam o desvio padrão e as letras a, b e c, representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre tempos para cada um dos tratamentos, segundo o teste de Tukey HSD de comparações múltiplas.

Tabela 1.8- Resultados das análises de variância de uma via efetuadas para comparar os parâmetros de crescimento de *L. minor*, entre tratamentos (diluções de efluente) em cada período de exposição, e dos respetivos testes de Dunnett para avaliação das diferenças relativamente ao controlo.

	F	P	d,f	Test de Dunnet
7 dias				
Frondes	12,12	<0,001	4,10	EB100%=CTL
Colónias	26,43	<0,001		EB100%=CTL
Peso fresco	4,03	0,033		EB100% e 50%=CTL
Peso seco	0,29	0.87		--
14 dias				
Frondes	7,28	0,0051	4,10	Todos ≠ CTL
Colónias	3.61	0,045		EB25% ≠ CTL
Peso fresco	8,35	0,003		Todos ≠ CTL
Peso seco	2,8	0,084		--
21 dias				
Frondes	154,10	<0,001	4,10	Todos ≠ CTL
Colónias	166,46			Todos ≠ CTL
Peso fresco	32,67			Todos ≠ CTL
Peso seco	38,11			EB100%=CTL

A tabela 1.8 representa ainda os resultados da análise de variância de uma via realizada para analisar as diferenças entre tempos de exposição para cada um dos tratamentos.

Pela análise conjunta ainda da tabela 1.8, que reporta os resultados da análise de variância de uma via, efetuadas para cada período de exposição, de forma a comparar os parâmetros entre os diferentes tratamentos, podemos confirmar que de facto, o crescimento no efluente bruto foi inibido, desde o início da exposição e que de facto se manteve até ao final, pois ao fim de 21 dias este foi o único tratamento para o qual não houve diferenças significativas em termos de peso seco, em relação ao controlo, onde de acordo com o que já referimos a inibição terá resultado do possível esgotamento de nutrientes. De facto as lentilhas-de-água produziram um maior número de frondes e de colónias, mas no que refere ao peso seco, que nos dá uma medida real da biomassa produzida esta não sofreu um aumento significativo. Este facto sugere que embora a planta consiga resistir à toxicidade do efluente, a sua fisiologia é comprometida. Não obstante este aspeto a planta continua a produzir frondes. Segundo alguns autores, as frondes de *Lemna sp.* conseguem remover compostos tóxicos do meio, os quais são posteriormente compartimentados na sua biomassa. Este mecanismo de bioissorção resulta ou na morte da espécie se a concentração dos compostos tóxicos é muito elevada, ou a lentilha-de-água é capaz de reproduzir novas frondes que crescem rapidamente enquanto os contaminantes são e aprisionados e eliminados com a biomassa morta (Mkandawire *et al*, 2013). Confirma-se assim que de facto a frondes das lentilhas-de água, expostas ao efluente, estavam a ser afetadas pela sua toxicidade e que as plantas estariam a responder produzindo novas frondes. Contudo, do ponto de vista de remoção da carga poluente de um efluente este processo fisiológico é uma desvantagem, pois caso a biomassa não seja renovada, todos os compostos que a integram vão regressar à fase aquosa com a mineralização da biomassa que decaiu.

No que refere aos parâmetros químicos do efluente, a variação dos seus valores médios entre tratamentos e para os diferentes tempos de exposição está representada nas figuras 19, 20 e 21. O CTL não foi introduzido nesta análise por se tratar de água do tanque à partida com diferenças muito significativas em termos de cor e índice fenólico relativamente ao efluente.

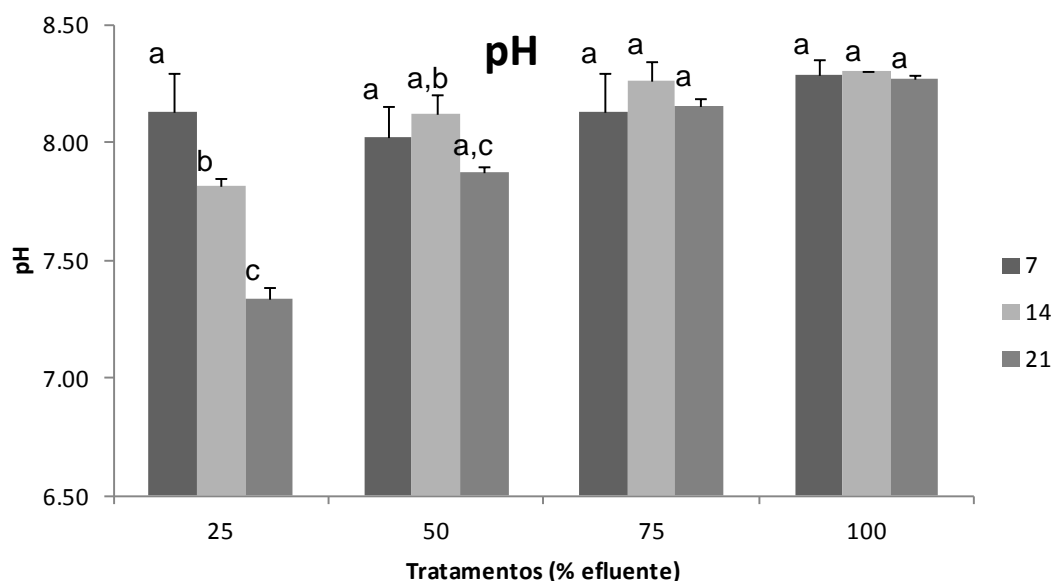


Figura 19. Variação do parâmetro pH entre tratamentos e tempos de exposição. As barras de erro representam o desvio padrão e as letras a, b e c, representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre tempos para cada um dos tratamentos, segundo o teste de Tukey HSD de comparações múltiplas.

No tratamento em que o efluente sofreu uma maior diluição (25%) registou-se uma diminuição altamente significativa do pH (Tabela 1.9), entre os diferentes tempos de exposição. Esta diminuição de pH não terá sido causada pela diluição, pois ao fim de 7 dias de exposição o pH era muito semelhante para os diferentes tratamentos. Assim, pode-se concluir que esta diminuição terá sido causada pela ação das lentilhas-de-água sobre o efluente, a qual ainda terá conseguido reagir nas diluições mais baixas, perdendo posteriormente essa capacidade com o aumento da concentração do efluente. Na diluição de 50% essa reação, com efeito sobre o pH, foi igualmente significativa, mas mais irregular. Como resposta a alterações do ambiente, as plantas são capazes de exudar compostos orgânicos de baixo peso molecular que podem iniciar processos de oxidação-redução para tornar os contaminantes menos tóxicos ou conjugá-los e facilitar a sua degradação (Mkandawire e Dudel, 2007). Entre os compostos que fazem parte dos exudados das plantas encontram-se iões H^+ , ácidos inorgânicos, oxigénio, água, mas sobretudo compostos orgânicos de baixo peso molecular como aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares, compostos fenólicos, e ainda uma vasta gama de metabolitos e compostos de elevado peso molecular como proteínas e mucilagens (Badri e Vivanco, 2009). A produção destes exudados pode ser estimulada por diversos fatores bióticos e abióticos, incluindo a resposta a contaminantes (Badri e Vivanco, 2009). Este processo poderá provocar alterações no pH, que não serão significativas ao fim de 7 dias, mas que se podem tornar como tal ao longo do tempo.

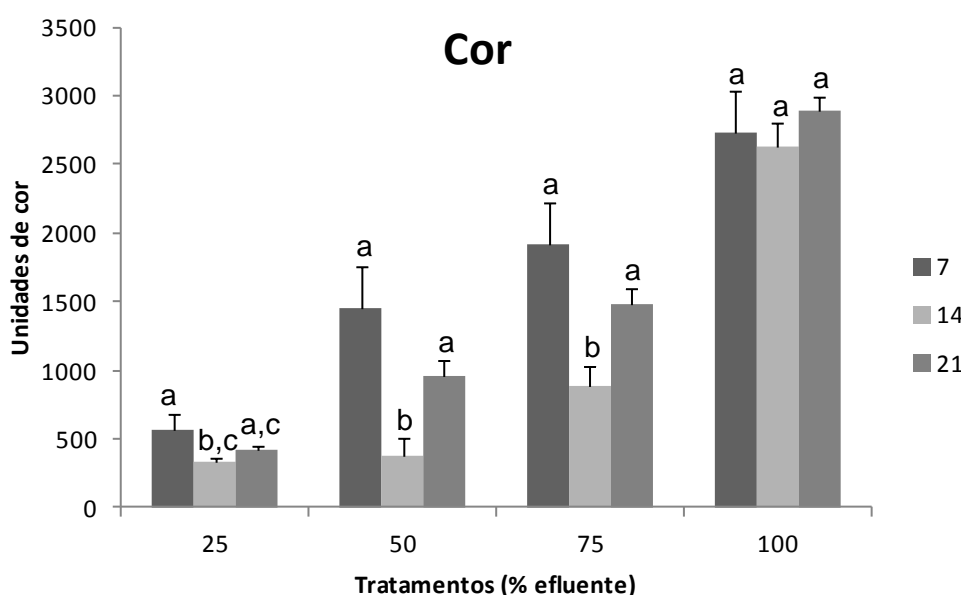


Figura 20. Variação do parâmetro cor entre tratamentos e tempos de exposição. As barras de erro representam o desvio padrão e as letras a, b e c, representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre tempos para cada um dos tratamentos, segundo o teste de Tukey HSD de comparações múltiplas.

No que refere à cor do efluente a sua variação foi significativa nos tratamentos com 25, 50 e 75% de efluente. No tratamento com efluente concentrado não se registou qualquer alteração significativa ao longo do tempo de exposição. Inclusivamente, os valores obtidos foram superiores ao registado na caracterização do efluente bruto (tabela 1.6). Sobretudo, nas diluições de 50 e 75% de efluente, a variação de cor foi interessante, pela ocorrência de um padrão comum de diminuição dos 7 para os 14 dias, e depois de novo um aumento para valores idênticos aos iniciais. Este facto sugere que em 14 dias as lentilhas-de-água podem de alguma forma conseguir remover alguns compostos com cor do meio, mas se permanecerem expostas mais tempo, esses compostos voltam a passar para a fase aquosa, um facto que vem corroborar o que já havíamos referido anteriormente. Por outro lado não se pode esquecer a possibilidade das reações de oxidação-redução que vão ocorrendo no efluente, poderem estar igualmente a contribuir de algum modo para esta variação de cor. Por outro lado, assume-se que a quantidade de biomassa colocada nos recipientes de ensaio pode não ter sido suficiente para a quantidade de efluente testado, não permitindo observar alterações de cor no efluente. A perda de cor verde das frondes é evidente no caso do ensaio dos 14 dias e 21 dias com o aumento da concentração do efluente bruto, acompanhada com a produção de uma quantidade elevada de depósito de cor escura. Tal como já foi referido atrás este depósito pode resultar da agregação e sedimentação de compostos do efluente, mas também da deposição de biomassa em decaimento. Da mesma forma que a ocorrência

da pigmentação escura em *L. minor* poderá ter resultado da acumulação de compostos orgânicos existentes nas águas ruças o que poderá explicar a redução de cor verificada aos 14 dias relativamente ao ensaio dos 7 dias (Megateli *et al.*, 2009; Uysal e Taner, 2010; Park *et al.*, 2012). Também se sabe que a acumulação de compostos fenólicos sintetizados pelas plantas, em resposta a condições de stress, é uma característica distintiva das plantas (Cheynier *et al.*, 2013). Esta produção resulta do facto de estes conferirem às plantas novas funções fisiológicas que lhes permitem adaptar-se a essas situações de stress (Lattanzio *et al.*, 2008, Garcia-Sánchez, 2012). Pelo que a pigmentação observada pode não ter resultado da remoção de compostos do efluente, mas sim da resposta ao stress das próprias plantas.

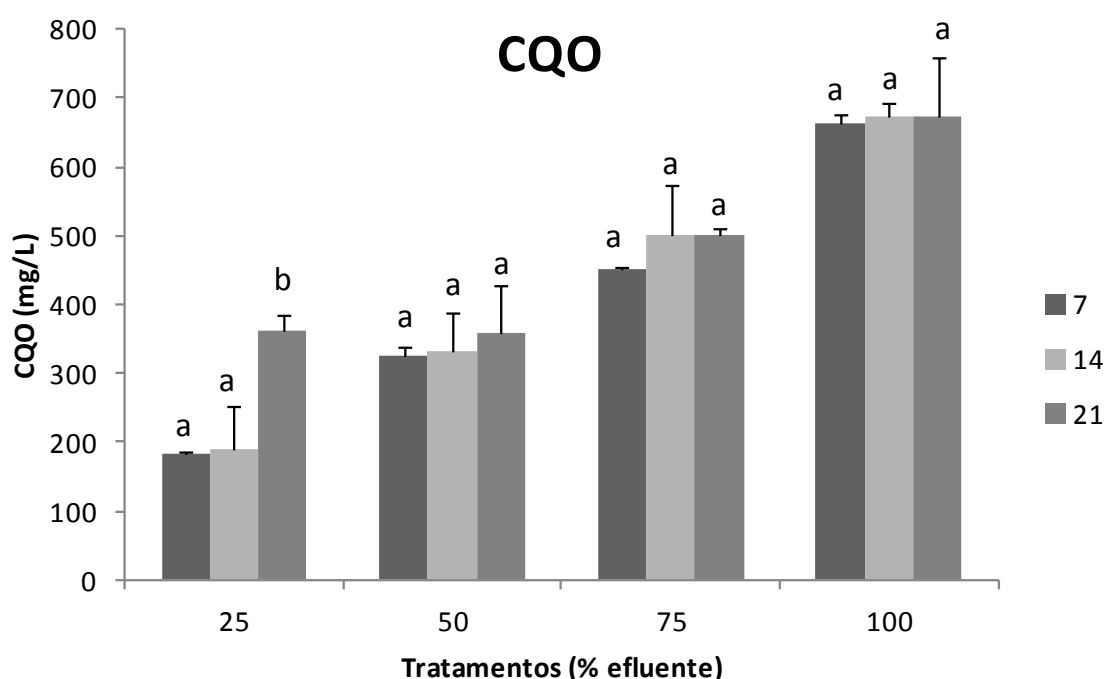


Figura 21. Variação do parâmetro CQO entre tratamentos e tempos de exposição. As barras de erro representam o desvio padrão.

No que refere ao CQO, apenas se registaram alterações significativas no tratamento de 25% de efluente e surpreendentemente com um aumento significativo, deste parâmetro após 21 dias de exposição. Tal como referido, este fato pode ser explicado pela limitação de nutrientes, provocada por um tempo de exposição mais prolongado, ou pela resposta à toxicidade do efluente, que resultou num aumento da exudação de certos metabolitos particularmente os que aumentam a disponibilidade de nutrientes resultando na biossíntese e acumulação de compostos fenólicos (Juszczuk *et al.*, 2004; Badri e Vivanco, 2009). A formação de depósito assim como a acumulação de matéria nas raízes

de *L. minor* observados predominantemente nos ensaios de 14 e 21 dias, poderá ser resultado tal como referido anteriormente da excreção de substâncias que podem formar complexos com substâncias existentes no meio.

Tabela 1.9. Resultados das análises de variância de uma via efetuadas para comparar os parâmetros físico-químicos do efluente, entre tempos de exposição para cada tratamento (diluição do efluente).

	F	p	d,f
100%EB			
Cor	1.10	0.39	2,6
pH	0.30	0.72	
CQO	0.03	0.98	2,3
75% EB			
Cor	19.03	0.02	2,6
pH	1.23	0.35	
CQO	0.94	0.48	2,3
50% EB			
Cor	20.74	0.002	2,6
pH	5.55	0.04	
CQO	0.25	0.80	2,3
25% EB			
Cor	8.08	0.020	2,6
pH	47.06	<0.001	
CQO	15.11	0.027	2,3

Tabela 1.10. Resultados obtidos para o índice fenólico no ensaio de viabilidade de 7, 14 e 21 dias.

Índice Fenólico (mg/L)				
	100% EB	75% EB	50% EB	25% EB
Ensaio 7 d	5,4	3,2	2,8	1,6
Ensaio 14 d	3,2	0,2	<0,5	0,5
Ensaio 21d	5,4	3,5	2,8	2,2

Relativamente ao parâmetro índice fenólico (Tabela 1.10), tal como verificado para o CQO, apenas foram registadas alterações ao longo do tempo de exposição para o tratamento de 25% de efluente, mas mais uma vez com um aumento para o tempo máximo de exposição, 21 dias. Esta diferença pode ter resultado do mesmo processo explicado para o CQO. Os valores obtidos para o tratamento de 100% de efluente para todos os tempos de exposição são da mesma ordem de grandeza ao registado na caracterização do efluente bruto (Tabela 1.6). Contudo estes resultados carecem de confirmação, uma vez que apenas foi possível fazer uma única determinação numa amostra composta constituída pela mistura das três réplicas de cada tratamento. Assim, e não se verificando uma melhoria na qualidade do efluente, os valores mais baixos para as outras concentrações resultaram aparentemente da diluição do efluente.

Os resultados brutos obtidos nos ensaios de viabilidade para os diferentes tempos de exposição estão apresentados no Anexo I (Tabelas A1, A2 e A3).

3.3. Ensaio Final de 14 dias com *L. minor*

O ensaio de exposição de 14 dias foi repetido para confirmar a ocorrência de pigmentação preta nas frondes de *L. minor*. Terminado o tempo de ensaio, não se verificou a formação das áreas pigmentadas nas frondes, pelo menos com a superfície regular tal como foi observado no ensaio anterior (Figura 10). Contudo, embora no controlo *L. minor* tenha mantido a cor verde, nas restantes concentrações houve uma diminuição da intensidade da cor, surgindo com cor amarela e castanha (Figura 22).

A repetição de ensaio confirmou o acréscimo de biomassa ao fim dos 14 dias já constatado no ensaio inicial, sobretudo para as concentrações mais baixas de efluente, com os valores de cor a manterem-se também nos valores já registados inicialmente (Tabela 1.11). Pelo facto de os resultados serem semelhantes, e apenas se ter analisado um tempo de exposição (14 dias) não se apresentam os dados do tratamento estatístico para este ensaio.

O registo realizado pela lupa binocular está representado na Figura 22.

Tabela 1.11 – Resultados do ensaio de 14 dias para os parâmetros: pH, peso seco (biomassa) e cor.

Concentração	pH ^a final	Biomassa ^a (mg)	Cor ^a (Pt-Co)
Controlo	7,49	11,5	38
100% E.B.	8,11	18,07	2156,67
75% E.B.	8,07	19,2	1739
50% E.B.	7,91	23,17	1095
25% E.B.	7,65	22,87	550,33

^amédia das réplicas

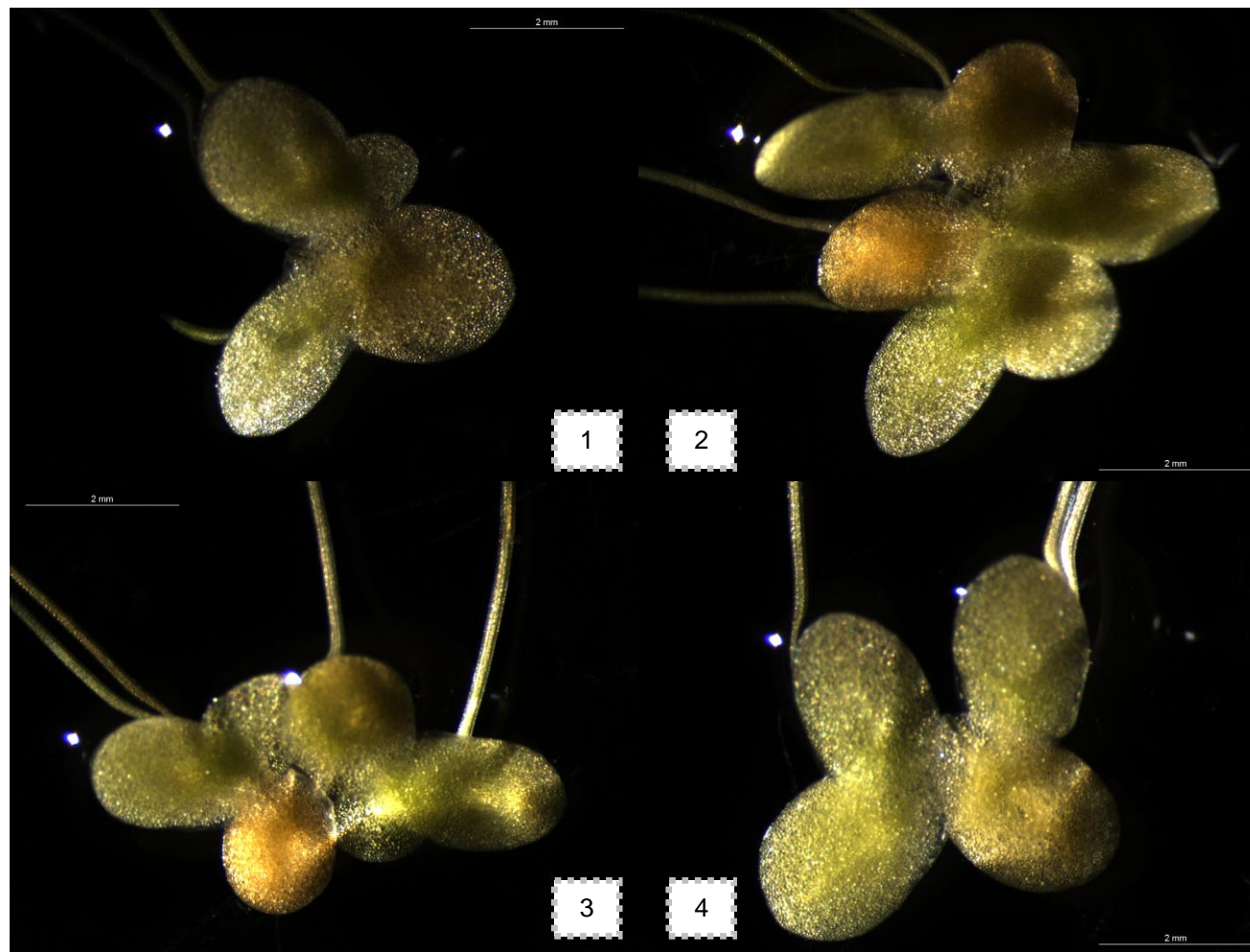


Figura 22 – Imagens (Ampliação 1.0x) de *L. minor* de uma réplica com 25% (1), 50% (2), 75% (3) e 100% (4) de efluente de lagar de azeite.

3.4. Ensaio de longa duração

3.4.1 Caraterização do efluente bruto

Na tabela 1.12 são apresentados os resultados obtidos na caraterização química do efluente bruto filtrado usado no ensaio de longa duração.

Tabela 1.12 – Caraterização química das águas ruças do ensaio de longa duração com *L. minor*.

Parâmetros / unidades	
pH	4,29
Cor ^a (Pt-Co)	2945
CQO ^a (mg/L)	17100
Índice fenólico ^a (mg/L)	3,7

^a amostra filtrada e congelada

Os valores de pH e CQO estão enquadrados nos valores encontrados na bibliografia (Duarte *et al.*, 2012; Justino *et al.*, 2012). Os valores para o parâmetro cor descritos em bibliografia foram obtidos por um método distinto, não permitindo uma comparação direta (Khoufi *et al.*, 2007; Amaral *et al.*, 2012).

No primeiro ensaio e após 7 dias as lentilhas-de-água apresentavam-se em todas as réplicas, com cor escura e mortas. Visualmente não apresentaram crescimento e desenvolvimento no efluente, ocorrendo a desintegração das frondes. O aspeto final pode ser visualizado na figura 23. Esta separação das frondes é uma resposta a substâncias tóxicas já reportada por outros autores (Slovin, 1997).



Figura 23 – Foto do ensaio de longa duração com *L. minor* no final de 7 dias.

Todas as réplicas incluindo as do controlo apresentavam depósito acumulado. Esta acumulação de sólidos depositados poderá ter resultado da sedimentação natural do efluente mas também no caso das réplicas com *L. minor*, da atividade das mesmas. Esta última afirmação deve-se ao fato dos exemplares de *L. minor* apresentarem resíduo agarrado quando retiradas das águas ruças (Figura 24).



Figura 24 – Foto do aspeto final de *L. minor*.

Verificou-se igualmente ao fim dos 7 dias uma subida substancial e surpreendente do pH quer nos controlos quer nas réplicas com *L. minor*. Tal facto leva a crer que esta alteração de pH, ainda que possa ter sido em parte causada pelas plantas deve ter resultado sobretudo de reações de oxidação-redução dos compostos do efluente. Pelo fato dos exemplares da espécie não terem ultrapassado 7 dias de ensaio neste efluente, e embora o pH das águas ruças fosse ácido, levou-nos a supor que as condições ambientais, nomeadamente a temperatura, poderão ter interferido no desenvolvimento das mesmas. A bibliografia existente comprova o crescimento desta espécie de macrófitas no intervalo de pH de 3,5 a 10 (Uysal e Taner, 2010), assim como a sua tolerância a uma elevada gama de temperaturas. Contudo, um destes fatores, ou a conjugação dos dois, pode ter sido responsável pela morte das plantas. A colocação do ensaio em condições ambientais, de luz e temperatura, tinha como objetivo começar por verificar qual o comportamento de *L. minor* numa situação mais real, mas os resultados não foram de todo o esperado. Deste modo, retiraram-se os exemplares mortos das réplicas e substituíram-se por novas frondes de *L. minor*, dando continuidade ao ensaio desta vez na câmara com ambiente controlado, nas condições já descritas na secção de material e métodos. Este foi assim considerado como sendo o tempo inicial do ensaio sem ajuste de pH, embora esse ajuste tenha ocorrido naturalmente.

Em simultâneo foi conduzido o ensaio com efluente bruto após correção de pH para valores superiores a 6, tendo como base o pH do efluente utilizado nos ensaios de viabilidade.

No final de 7 dias em todas as réplicas de ambos os ensaios, sem correção de pH e com correção de pH, *L. minor* apresentava-se bem desenvolvida mantendo a cor verde. Era visível a acumulação e agregação de sólidos no fundo dos recipientes em todas as réplicas, incluindo no controlo. A concentração de depósito era maior nas réplicas do ensaio que se iniciou primeiro, ou seja sem o ajuste do pH, possivelmente pelo fato de o ensaio ter 7 dias de avanço de tratamento. *L. minor* também apresentava a acumulação de resíduo nas suas raízes sendo igualmente superior a acumulação no ensaio que iniciou em primeiro lugar. Alguns dos compostos fenólicos presentes nas águas ruças, estão envolvidos na biossíntese de lenhina, pelo que peroxidases, ligadas por ligações covalentes à parede das células das raízes, podem promover a ligação de alguns destes compostos às paredes promovendo o seu espessamento. Tal facto, pode estar na origem da acumulação de resíduo nas raízes das lentilhas-de-água, um fenómeno que já foi observado em raízes de plântulas de tomate, expostas a resíduo seco de efluente de lagar de azeite seco (Dragšić *et al.*, 2008). O aspeto de *L. minor* pode ser visualizado nas figuras 25, 26 e 27.

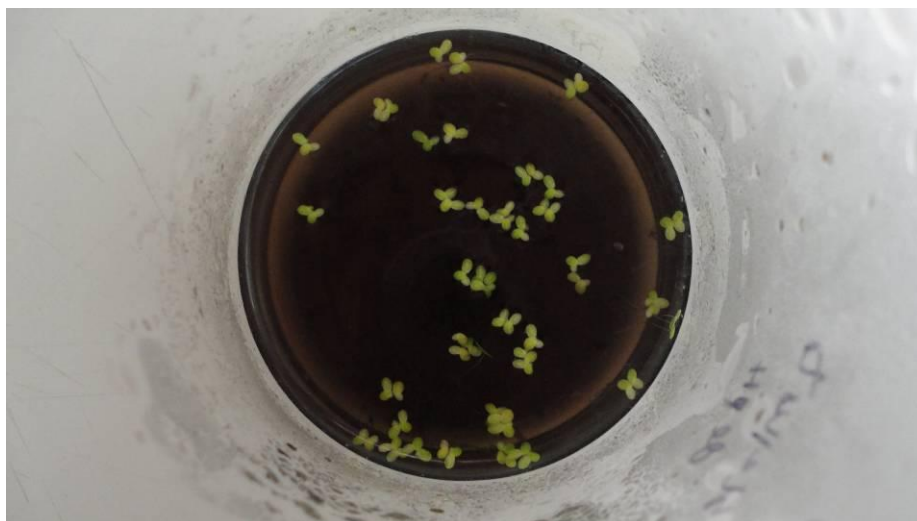


Figura 25 – Foto do aspeto final de *L. minor* no ensaio sem ajuste de pH.



Figura 26 – Aspeto final de *L. minor* com acumulação de resíduo do ensaio sem ajuste de pH.



Figura 27 – Aspeto final de *L. minor* com acumulação de resíduo do ensaio com ajuste de pH.

O fato de *L. minor* se terem mantido em boas condições, ao fim de 7 dias na câmara, permitiu-nos concluir que terão sido as condições ambientais, nomeadamente a temperatura variável que chegou a atingir valores superiores a 25°C que terão provocado a morte dos exemplares.

Decorridos mais 7 dias do ensaio, nas réplicas com renovação de plantas apresentavam-se bem desenvolvidas e mantinham a coloração verde original. Nas réplicas do ensaio, sem ajuste de pH, tinham maior quantidade de depósito acumulado no fundo do recipiente e as plantas também possuíam acumulação de sólidos adsorvidos às raízes.

O resíduo formado nas réplicas do ensaio com correção de pH não se apresentava agregado mas sim disperso e semelhante a uma “nuvem” e menos escuro. As lentilhas-de-água apresentavam algum depósito acumulado nas raízes mas em menor quantidade.

Nas réplicas de ambos os ensaios sem renovação de plantas, verificou-se que as mesmas estavam a perder a cor original apresentando-se com frondes na maioria amarelas mas bem desenvolvidas. Contudo, e ainda que com esta alteração as plantas mantiveram-se viáveis até ao final de ambos os ensaios (67 dias para o ensaio sem ajuste de pH e 60 dias para o ensaio com ajuste de pH).

Nas réplicas com renovação de plantas, em ambos os ensaios, à medida que as renovações iam ocorrendo, no final as plantas apresentavam cada vez menos material adsorvido às raízes. O que sugere que, certamente que os compostos passíveis de serem adsorvidos estavam a diminuir em solução.

O aspeto da *L. minor* no final do ensaio está representado nas seguintes tabelas:

Tabela 1.13a – Aspeto final de *L. minor* do ensaio de longa duração sem ajuste de pH.

R4 do ensaio sem ajuste de pH e sem renovação de biomassa	
R5 do ensaio sem ajuste de pH e sem renovação de biomassa	

Tabela 1.13b – Aspeto final de *L. minor* do ensaio de longa duração sem ajuste de pH.

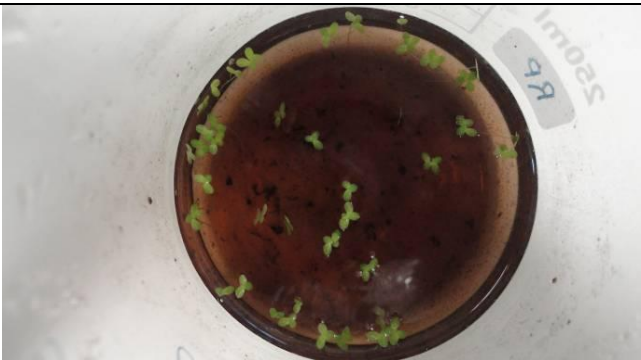

R8 do ensaio sem ajuste de pH e com renovação de biomassa	
R8 do ensaio sem ajuste de pH e com renovação de biomassa	

Tabela 1.14a – Aspeto final de *L. minor* do ensaio de longa duração com ajuste de pH.

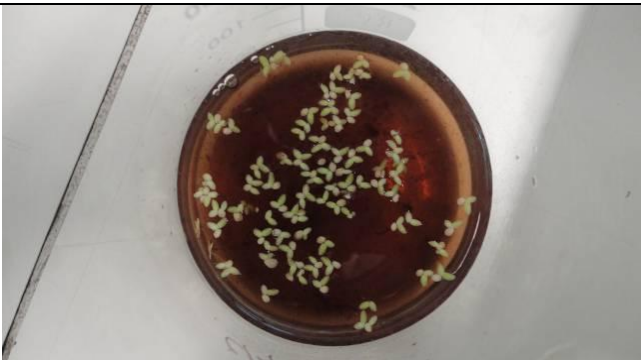
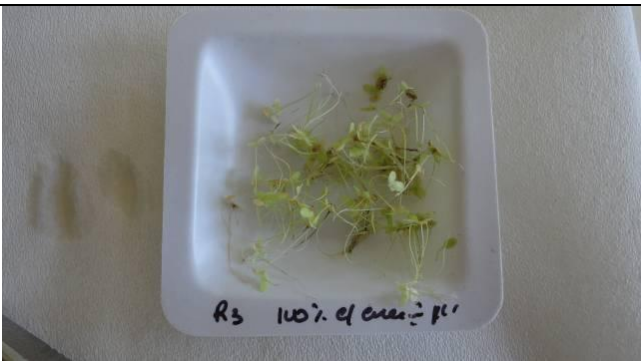
R6 do ensaio com ajuste de pH e sem renovação de biomassa	
R6 do ensaio com ajuste de pH e sem renovação de biomassa	

Tabela 1.14b – Aspeto final de *L. minor* do ensaio de longa duração com ajuste de pH.

R8 do ensaio com ajuste de pH e com renovação de biomassa	
R9 do ensaio com ajuste de pH e renovação de biomassa	

Para as réplicas (R7, R8 e R9) dos 2 ensaios cujas *L. minor* foram sendo substituídas ao longo dos 28 dias, colocaram-se aleatoriamente exemplares da espécie nas réplicas de modo a cobrir quase a totalidade do efluente (Figura 28).

Figura 28 – Foto do efluente coberto totalmente por *L. minor*

E os copos voltaram para a câmara mais 14 dias, onde permaneceram nas mesmas condições de luminosidade, temperatura e fotoperíodo. Esta etapa tinha como objetivo testar ao máximo a capacidade de depuração do efluente, uma vez que nos ensaios

anteriores já se havia verificado que no efluente bruto não diluído as plantas aumentam a sua biomassa pelo menos até aos 21 dias de exposição, ainda que esse aumento seja menor quando o efluente está menos concentrado (vide secção 3.2). Ao fim de 14 dias, retiraram-se as frondes de *L. minor* das réplicas, mediu-se o pH das réplicas e voltaram-se a colocar novos exemplares a cobrir o efluente. Nestas últimas renovações não se registou o peso fresco e seco das plantas, pois o crescimento da mesma não era o que se pretendia avaliar. Além do mais, e tal como foi registado por Teixeira *et al.* (2013), ao cobrirmos a totalidade da área superficial do efluente com frondes, estamos a limitar à partida o crescimento por falta de espaço.

Os precipitados formados no fim dos ensaios, sem e com ajuste de pH, apresentavam-se com aspeto e cor distintos. A cor do efluente era mais amarela nas réplicas onde o pH foi corrigido e o depósito formado era menos consistente e mais disperso. Nas réplicas em que não foi corrigido o pH apresentavam-se com cor mais escura e os sólidos mais agregados (Tabela 1.15a). O mesmo se verificou no caso dos controlos, em que nas réplicas onde se ajustou o pH a cor ficou mais amarela e depósito mais disperso, enquanto nas réplicas sem ajuste de pH o efluente ficou mais escuro e o precipitado mais consistente (Tabela 1.15b).

Tabela 1.15a – Aspeto final do efluente do ensaio de longa duração com e sem ajuste de pH.

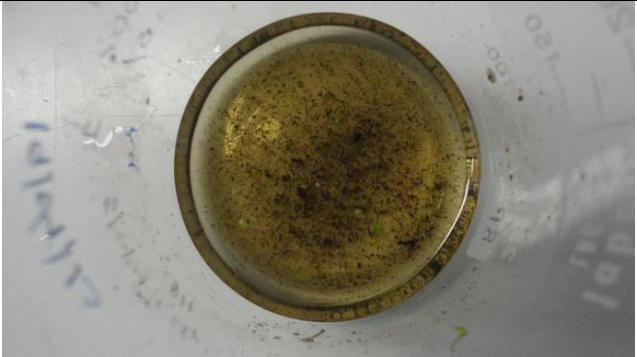
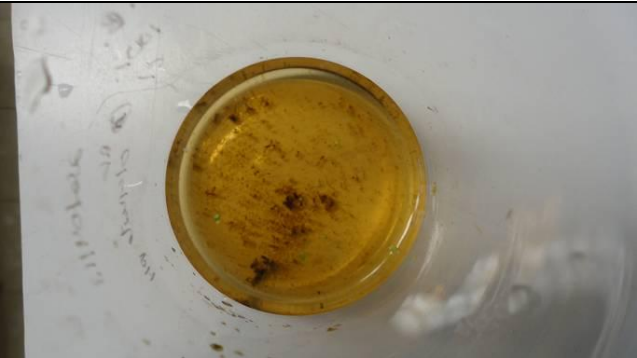


R7 do ensaio sem ajuste de pH e com renovação de biomassa	
R9 do ensaio com ajuste de pH e com renovação de biomassa	

Tabela 1.15b – Aspeto final do efluente dos controlos do ensaio de longa duração com e sem ajuste de pH.

R2 do controlo do ensaio sem ajuste de pH	
R1 do controlo do ensaio com ajuste de pH	

Os resultados brutos obtidos para ambos os ensaios estão representados no Anexo I (Tabelas A4 e A5).

Nas figuras 29 e 30 estão representados os resultados obtidos para os ensaios, em termos de variação de peso seco médio e de número médio de frondes das lentilhas-de-água, no final de cada 7 dias de renovação do ensaio sem ajuste de pH.

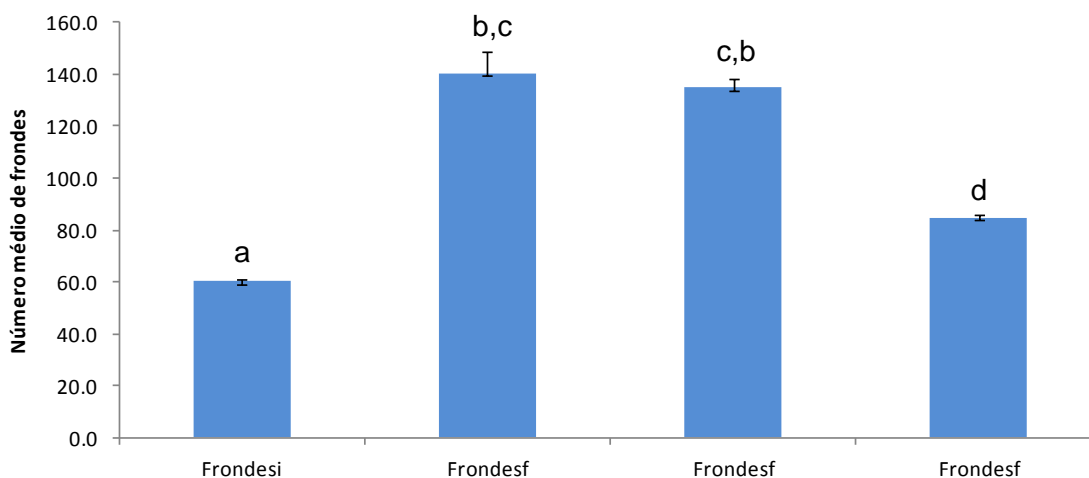


Figura 29. Número médio de frondes, no final de cada 7 dias de renovação, para o ensaio de longa duração, sem ajuste de pH. As barras representam o desvio padrão e as letras representam as diferenças significativas entre grupos com base no teste de Tukey- HSD.

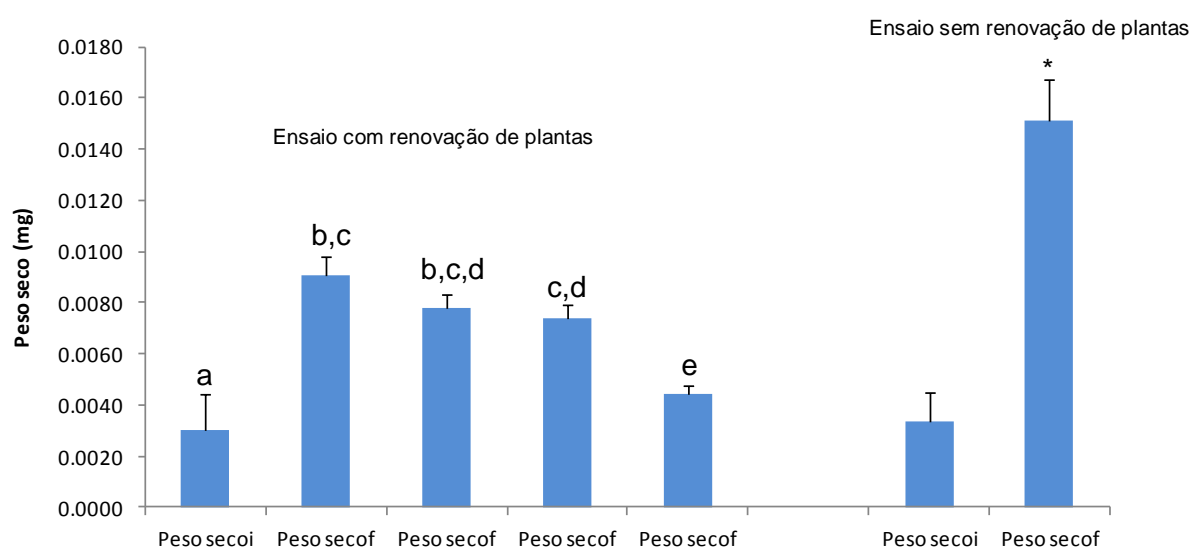


Figura 30. Peso seco médio, no final de cada 7 dias de renovação, para o ensaio de longa duração, sem ajuste de pH (esquerda). E no início e no final do ensaio para as réplicas sem renovação de plantas (direita). As barras representam o desvio padrão e as letras representam as diferenças significativas entre grupos com base no teste de Tukey- HSD. O asterisco indica diferenças significativas entre grupos.

A análise estatística dos dados demonstrou que houve sempre um crescimento muito significativo das lentilhas-de-água, durante os 7 dias em que permaneceram no efluente, sendo isto revelado quer pelo número de frondes ($F= 225,036$; d.f. 8,11; $p<0,001$) quer

pelo peso seco ($F=81,328$; d.f.= 10,14; $p<0,001$) registados no final de cada sete dias. Na última renovação o crescimento de *L. minor* ainda que tenha ocorrido foi sempre inferior ao registado para as renovações anteriores. E de facto esta diminuição do crescimento foi ocorrendo progressivamente ao longo do tempo. Tal facto, leva-nos a acreditar que ao longo do tempo o efluente sofreu de facto alterações químicas, e subsequentemente alterações de toxicidade, provocadas pela deposição de alguns compostos e a solubilização de outros, o que terá contribuído para afetar progressivamente a viabilidade das plantas. Estes resultados remetem-nos para a questão do armazenamento das águas ruças, onde durante esse período ocorre a auto-oxidação dos compostos fenólicos com formação de compostos de elevado peso molecular que têm um caráter mais recalcitrante e são mais difíceis de degradar por tratamento biológico (Justino *et al.*, 2012) A alteração na disponibilidade de nutrientes facilmente absorvidos e utilizados pelas plantas pode também ser uma razão para o facto.

No ensaio com ajuste de pH o padrão de crescimento de *L. minor* foi semelhante ao registado no caso anterior, como pode ser verificado pelas figuras 31 e 32. Pelo que se registaram diferenças significativas entre o número médio de frondes produzidas nas diferentes renovações ($F=85,311$; d.f. 8,11, $p<0,001$) e o peso seco das lentilhas-de-água ao fim de 7 dias de crescimento ($F=53,729$; d.f. 10,14; $p<0,001$) (Figuras 31 e 32).

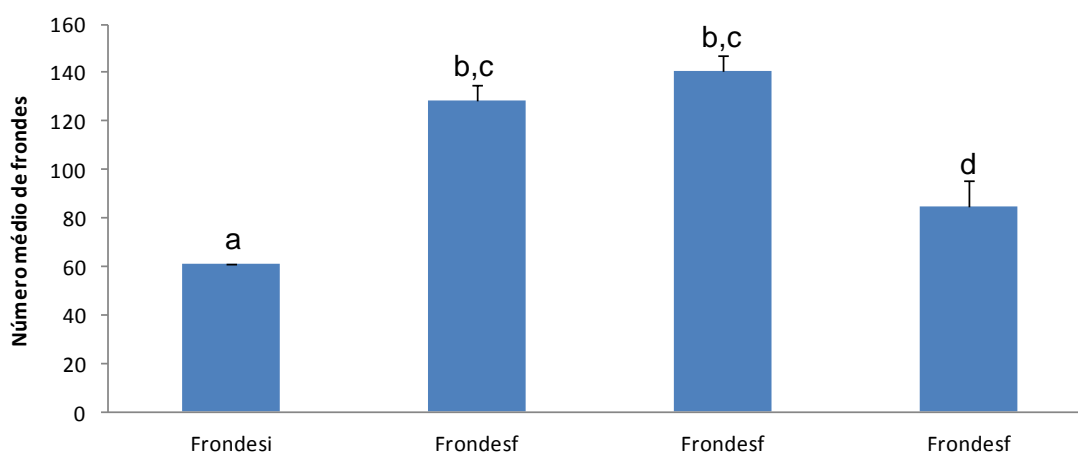


Figura 31. Número médio de frondes, no final de cada 7 dias de renovação, para o ensaio de longa duração, com ajuste de pH. As barras representam o desvio padrão e as letras representam as diferenças significativas entre grupos com base no teste de Tukey- HSD.

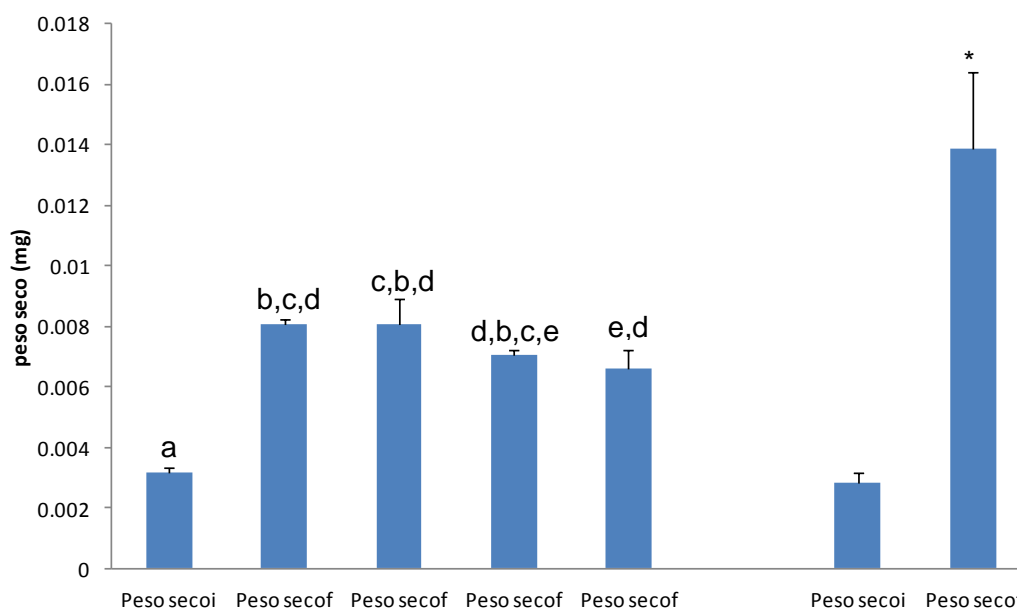


Figura 32. Peso seco médio, no final de cada 7 dias de renovação, para o ensaio de longa duração, com ajuste de pH (esquerda). E no início e no final do ensaio para as réplicas sem renovação de plantas (direita). As barras representam o desvio padrão e as letras representam as diferenças significativas entre grupos com base no teste de Tukey- HSD. O asterisco indica diferenças significativas entre grupos.

Em ambos os ensaios, com e sem ajuste de pH, nas réplicas onde se mantiveram as *L. minor* sem substituição, o crescimento das lentilhas-de-água, avaliado pelo aumento de peso seco, foi muito significativo ($F=108.88$; d.f. 4,5; e $p=0,0004$) e superior ao verificado nas réplicas onde ocorreu a substituição periódica, o que seria de esperar pois o tempo que permaneceram no meio do efluente foi superior. Contudo o aumento de peso seco registado ao fim de 60 dias, não chegou a ser igual ao dobro dos valores registados na 1ª e 2ª renovações, o que leva a acreditar que de facto neste mesmo ensaio acabou por haver inibição do crescimento.

Na tabela 1.16 estão representados os valores dos parâmetros físico-químicos do efluente, no controlo sem plantas e nos tratamentos sem renovação das lentilhas-de-água (TSR) ou com renovação das mesmas (TCR). No que refere ao pH no final do ensaio com renovação houve uma alteração significativa do pH para valores próximos do valor inicial do efluente ($pH= 4,3$). Em suma após o aumento de pH que ocorreu sem qualquer intervenção no início do ensaio, em todas as réplicas incluindo no controlo, esta alteração significativa no final apenas no TCR, sugere que de facto as plantas tiveram uma ação sobre o efluente, aumentando a sua acidez, tal como ocorreu para os restantes ensaios. Para o mesmo tratamento registou-se igualmente uma redução significativa da cor, a qual foi acompanhada de uma redução do índice fenólico, mas não do nível de

CQO. Tal facto sugere que de facto poderá ter havido remoção de compostos com cor do efluente quer por deposição quer por ação das plantas, mas de qualquer modo o nível de compostos recalcitrantes em solução no efluente parece ter aumentado, ainda que esses compostos possam não ser responsáveis pela cor do efluente. De qualquer modo a melhoria dos parâmetros físico-químicos ocorreu sempre no TCR, onde as lentilhas-de-água se mantiveram sempre viáveis, no período em que estavam no efluente.

No que refere ao ensaio com ajuste de pH, não se verificaram alterações significativas, quer em termos de cor ($F=1,42$; d.f 6, 8; $p=0,312$) quer de pH ($F=0,016$; d.f. 6,8; $p=0,984$) entre tratamentos, no final do ensaio. No caso da CQO houve inclusivamente um ligeiro aumento, no tratamento sem renovação de plantas, o que pode realmente ter resultado de exudados das plantas, na medida em que se registou em paralelo um aumento do índice fenólico relativamente ao controlo. No tratamento com renovação estes parâmetros diminuíram para valores semelhantes ou inferiores ao do controlo.

Tabela 1.16 - Variação dos parâmetros físico-químicos do efluente nos diferentes tratamentos do efluente com e sem ajuste de pH.

	pH	Cor (Pt-Co)	CQO ^a (mg/L)	Índice fenólico ^a (mg/L)
Ensaio sem ajuste de pH				
Tratamentos				
CTL	8,0±0.1	4853,0±629,39	688	3.7
TSR	7,86±0,05	5220,0±60,0	974	4
TCR	5,06±0,17*	3600,0±465,19*	1172	2.8
Ensaio com ajuste de pH				
CTL	8,69±0.04	5300,0±926,01	702	2
TSR	8,63±0.02	5240,0±507,15	1582	3
TCR	8,66±0,64	6237,7±931,6	996	1,6

^aparâmetros determinados apenas numa réplica por tratamento; Asteriscos representam diferenças significativas relativamente ao CTL, segundo o teste de Tukey HSD

4. Conclusões

Fazendo uma análise global aos ensaios de viabilidade constatou-se que à medida que a concentração do efluente aumentou os valores médios para o nº de frondes, nº de colónias, peso fresco e seco diminuíram para concentrações acima de 50% de efluente. Os valores mais elevados foram atingidos para esta concentração ou na concentração de 25%. Este ensaio permitiu perceber que embora *L. minor* seja bem mais tolerante ao efluente do que o esperado, o que á partida seria uma mais-valia para a sua utilização na fitorremediação do mesmo, para garantir a atividade da planta, será sempre necessário diluir o efluente ou reduzir o tempo de exposição da planta ao efluente. Uma vez que a diluição dos elevados volumes de efluente produzidos anualmente, para 50% teria mais uma vez um enorme custo ambiental, testou-se a eficácia de tratamentos com renovações da biomassa vegetal de 7 em 7 dias. Os resultados obtidos sugerem que mantendo biomassa fisiologicamente ativa no efluente, há tendência para haver a melhoria de alguns parâmetros nomeadamente a cor e o índice fenólico do efluente. Contudo, os resultados sugerem ainda que mesmo com a presença das plantas as reações de oxidação-redução continuam a ocorrer no efluente, até certamente estimuladas pelo oxigénio que estas libertam, dando possivelmente origem a novos compostos recalcitrantes, que vão contribuir para um aumento da carência química de oxigénio do efluente. O aumento destes compostos por sua vez poderá ser responsável pela inibição progressiva do crescimento das plantas no efluente, observada ao longo do tempo, apesar do tempo de exposição ser igual. Por outro lado também foi evidente, que apesar da larga gama de tolerância reportada para *L. minor*, em termos de pH e temperatura, esta gama é certamente reduzida quando a planta está exposta a um efluente altamente tóxico, o que leva a que o sucesso de um tratamento destes esteja largamente dependente de outros fatores abióticos como temperatura e pH. Tal facto leva a que seja certamente difícil a sua execução em tanques exteriores.

No entanto são precisos mais estudos para analisar a performance de *L. minor* no efluente de lagar de azeite, em diferentes condições ambientais. No entanto, os tanques teriam que ser de baixa profundidade, a superfície toda do efluente teria que ser coberta com lentilhas-de-água na totalidade, e teriam que ser renovadas a cada 7 dias. Esta biomassa pode contudo dar origem a um resíduo interessante para fertilização, na medida em que embora pareça remover compostos orgânicos do efluente, esta remoção ocorre em pequenas quantidades de cada vez, sobretudo por adsorção às raízes, o que reduz a potencial toxicidade do resíduo, e subseqüentemente garante a sua valorização. Neste estudo parte da falta de eficácia dos tratamentos de longa duração pode também

ter resultado do facto de não se ter coberto totalmente a superfície do efluente com frondes, desde o início do ensaio.

Com este estudo subsistem duas dúvidas: i) se por um lado as plantas não podem elas próprias contribuir com compostos fenólicos para a fase aquosa do efluente, uma vez que estes compostos são libertados pela maior parte das plantas em respostas a condições de stress, como por exemplo a falta de nutrientes ou a exposição a determinados contaminantes. O aumento do índice fenólico e da cor nos ensaios de longa duração sem renovação parecem sugerir que sim; e por outro lado ii) também foi difícil de perceber se de facto a planta teve um papel significativo ou não na formação de agregados de resíduos orgânicos no efluente. Num estudo futuro este aspeto terá que ser quantificado de algum modo, pois pode ser uma forma de acelerar a deposição dos compostos orgânicos do efluente.

Em termos globais, o aspeto que parece dificultar de forma mais significativa futuras aplicações em larga escala de *L. minor*, na fitorremediação de águas ruças, parece ser a enorme quantidade de biomassa que seria preciso produzir em paralelo para os grandes volumes de efluente produzidos.

5. Referências Bibliográficas

Amaral C., Lucas M.S., Sampaio A., Peres J.A., Dias A.A., Peixoto F., Anjos M.R., Pais C., 2012. Biodegradation of olive mil wastewaters by a wild isolate of *Candida oleophila*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 68: 45 – 50.

Asfi M., Ouzounidou G., Panajiotidis S., Therios I., moustakas M., 2012. Toxicity effects of olive-mill wastewaters on growth, photosynthesis and pollen motphology of spinach planta. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80: 69 – 75.

Babu T.S., Marder J.B., Tripuranthakam S., Dixon D.G., Greenberg B.M., 2001. Synergistic effects of a photooxidized polycyclic aromatic hydrocarbon and copper on photosynthesis and plant growth: Evidence that in vivo formation of reactive oxygen species is a mechanism of copper toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 1351 - 1358.

Bais, H.P., Vepachedu R., Gilroy S., Callaway R.M., Vivanco J.M., 2003. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. *Science* 301: 1377 – 1380.

Barber J.T., Sharma H.A., Ensley H.E., Polito M.A., Thomas D.A., 1995. Detoxification of phenol by the aquatic angiosperm *Lemna gibba*. *Chemosphere* 31 (6): 3567 – 3574.

Biswas D.K., Scannell G., Akhmetov N., Fitzpatrick D., Jansen M.A., 2010. 2,4,6-Trichlorophenol mediated increases in extracellular peroxidase activity in three species of Lemnaceae. *Aquatic Toxicology* 100: 289 - 94.

Bocuk H., Yakar A., Turker O.C., 2013. Assessment of *Lemna gibba* L. (duckweed) as a potencial ecological indicator for contaminated aquatic ecosystem by boron mine effluent. *Ecological Indicators* 29: 538 – 548.

Bradi D.V., Vivanco J.M., 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell and Environment* 32: 666 – 681.

Brkanac S.R., Stipanicev D., Širac S., Glavaš K., Pevalek-Kozlina B., Proceedings BALWOIS 2010, Ohrid, Republic of Macedonia.

Caicedo J.R., Van Der Steen N.P., Arce O., Gijzen H.J., 2000. Effect of Total Ammonia Nitrogen Concentration And pH On Growth Rates of Duckweed (*Spirodela Polyrhiza*). *Wat. Res.* 34(15): 3829 – 3835.

Cayuela M.L., Millner P., Slovin J., Roig A., 2007. Duckweed (*Lemna gibba*) growth inhibition bioassay for evaluating the toxicity of olive mill wastes before and during composting. *Chemosphere* 68: 1985 - 1991.

Christen O., Theuer C., 1996. Sensitivity of *Lemna* bioassay interacts with stockculture period. *J. Chem. Ecol.* 22: 1177 - 1186.

Coleman J.O.D., Blake-Kalff M.M.A., Davies T.G.E., 1997. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci.* 2: 144 – 151.

Cruz-Ortega R., Lara-Núñez A., Anaya A.L., 2007. Allelochemical stress can trigger

oxidative damage in receptor plants mode of action of phytotoxicity. Plant Signal. Behav. 2: 269 – 270.

Dakora F.D., Phillips D.A., 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. Plant and soil 245: 35 – 47.

Davis S.M., Drake K.D., Maier K.J., 2002. Toxicity of boron to the duckweed, *Spirodella polyrrhiza*. Chemosphere 48: 615 - 620.

Dewez D, Eullaffroy P, Popovic R, Juneau P., 2007. Rapid chlorophyll a fluorescence transientes of *Lemna minor* leaves as indication of light and exogenous electron carriers effect on photosystem II activity. Photochemistry and Photobiology 83: 714 - 721.

Della Greca M.; Monaco P.; Pinto G.; Pollio A.; Previtera L.; Temessi F., 2001. Phytotoxicity of low molecular weight phenols from olive mill waste waters. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 67: 352 – 359.

Duarte K.R., Freitas A.C., Pereira R., Pinheiro J.C., Gonçalves F., Azaari H., Azzouzi M.E., Zrineh A., Zaydoun S., Duarte A.C., Rocha-Santos T.A.P., 2012. Treatment of Olive Oil Mill Wastewater by Silica-Alginate-Fungi Biocomposites. Water Air Soil Pollut. 223: 4307 – 4318.

Maksimovic J.D., Maksimovic V., Zivanovic B., Sukalovic V. H., Vuletic M., 2008. Peroxidase activity and phenolic compounds content in maize root and leaf apoplast, and their association with growth. Plant Science 175: 656 – 662.

Einhellig, F.A., Leather, G.R., Hobbs, L.L., 1985. Use of *Lemna minor* L. as a bioassay in alleopathy. J. Chem. Ecol. 11: 65 - 72.

Fiorentino A.; Gentili A.; Isidori M.; Monaco P.; Nardelli A.; Parrella A.; Temussi F., 2003. Environmental effects caused by olive mill wastewaters: toxicity comparison of low molecular weight phenol components. J. Agric. Food Chem., 51: 1005 - 1009.

Garcia-Sanchez M., Garrido I., Casimiro I.J., Casero P.J., Espinosa F., García-Romera I., Aranda E., 2012. Defense response of tomato seedlings to oxidative stress induced by phenolic compounds from dry olive mill residue. Chemosphere 89: 708 - 716.

Greenberg B.M., Huang X.-D., Dixon D.G., 1992. Applications of the aquatic higher plant *Lemna gibba* for ecotoxicological assessment. J. Aquat. Ecosyst. Health 1: 147 - 155.

Hillman W., 1961. The Lemnaceae, or duckweeds. Bot. Rev. 27: 221 - 287.

Isidori M., Lavorgna M., Nardelli A., Parrella A., 2005. Model Study on the Effect of 15 Phenolic Olive Mill Wastewater Constituents on Seed Germination and *Vibrio fischeri* Metabolism. J. Agric. Food Chem., 53: 8414 – 8417.

Jones D.L., 1998. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. Plant and soil 205: 25 - 44.

Justino C.I., Duarte K., Loureiro F., Pereira R., Antunes S.C., Marques S.M., Gonçalves F., Rocha-Santos T.A.P., Freitas A.C., 2009. Toxicity and organic content characterization

of olive oil mill wastewater undergoing a sequential treatment with fungi and photo-Fenton oxidation. J Hazard Mat 172: 1560 – 1572.

Justino C.I., Pereira R., Freitas A.C., Rocha-Santos T., Panteleitchouk T., Duarte A.C., 2012. Olive oil mil wastewater befor and after treatment: a critical review from the ecotoxicological point of view. Ecotoxicol 21: 615 – 629.

Juszczuk I.M., Wiktorowska A., Malusá E., Rychter A.M., 2004. Changes in the concentration of phenolic compounds and exudation induced by phosphate deficiency in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant and Soil 267: 41 – 49.

Khellaf N., Zerdaoui M., 2009. Phytoaccumulaton of zinc by the aquatic plant, Lemna gibba L. Bioresour. Technol., 100: 1637 – 1640.

Khellaf N., Zerdaoui M., 2010. Growth response of the duckwedd Lemna gibba L. to copper and nickel phytoaccumulation. Ecotoxicology 19: 1363 – 1368.

Khoufi S., Feki F., Sayadi S., 2007. Detoxification of olive mill wastewater by electrocoagulation and sedimentation processes. J Hazard Mater 142 : 58 – 67.

Lattanzio V., Kroon P.A., Quideau S., Treutter D., 2008. Plant phenolics e secondary metabolites with diverse functions, in: F. Daayf, V. Lattanzio (Eds.), Recent Advances in Polyphenol Research, vol. 1, Wiley-Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp. 1 e 35.

Maksimovic J.D., Maksimovic V., Zivanovic B., Sukalovic V. H., Vuletic M., 2008. Peroxidase activity and phenolic comounds contentin maize root and leaf apoplast, and their association with growth. Plant Science 175: 656 – 662.

Marwood C.A., Solomon K.R., Greenberg B.M., 2001. Chlorophyll fluorescence as a bioindicator of effects on growth in aquatic macrophytes from mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons. Environmental Toxicology and Chemistry 20: 890 - 898.

McCutcheon S.C., Schnoor J.L. (Eds.), 2003. Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants. John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey.

Megateli S., Semsari S., Couderchet M., 2009. Toxicity and removal of heavy metals (cadmium, copper and zinc) by Lemna gibba. Ecotoxicology and Environmental Safety 72: 1774 – 1780.

Miller J. N., & Miller J. C., 2005. Statistics and chemometrics for analytical chemistry (5th ed.). New York: Prentice Hall.

Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Sci. 9: 490 – 498.

Miretzky P., Saralegui A., Cirelli A.F., 2004. Aquatic macrophytes potencial for the simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina). Chemosphere 57: 997 – 1005.

Mkandawire M., Dudel E.G., 2007. Are *Lemna spp.* Effective Phytoremediation Agents?. Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability 1(1): 56 – 71.

Mkandawire M., Teixeira da Silva J. A. & E. Dudel G., 2013. The Lemna Bioassay: Contemporary issues as the most standardised plant bioassay for aquatic ecotoxicology. Environmental Science and Technology – Publicado on-line

Naumann B., Eberius M., Appenroth K., 2007. Growth rate based dose-response relationships and EC-values of ten heavy metals using the duckweed growth inhibition test (ISO 20079) with *Lemna minor* L. clone St. Journal of Plant Physiology 164: 1656 – 1664.

O'Dell J.W., 1993. Method 410.4, Revisão 2: The Determination of Chemical Oxygen Demand by Semi-Automated Colorimetry. Environmental Monitoring Systems Laboratory Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio 45268.

Ochs M., Brunner I., Stumm W., Cosovic B., 1993. Effects of root exudates and humic substances on weathering kinetics. Water, Air, and Soil Pollution 68: 213 – 229.

Park J., Brown M.T., Han T., 2012. Phenol toxicity to the aquatic macrophyte *Lemna paucicostata*. Aquatic Toxicology 106-107: 182 – 188.

Parlak K.U., Yilmaz D.D., 2013. Ecophysiological tolerance of *Lemna gibba* L. exposed to cadmium. Ecotoxicology and Environmental Safety 91: 79 – 85.

Perreault F., Oukarroum A., Pirastru L., Sirois L., Matias W.G., Radovan, 2010. Evaluation of copper oxide nanoparticles toxicity using chlorophyll a fluorescence imaging in *Lemna gibba*. J. Bot., doi:10.1155/2010/763142 (Article ID 763142).

Priya A., Avishek K., Pathak G., 2012. Assessing the potentials of *Lemna minor* in the treatment of domestic wastewater at pilot scale. Environ. Monit. Assess 184: 4301 – 4307.

Quinn G.P., Keoug M.J., 2002. Experimental Design and Data Analysis for Biologists, Cambridge, University Press Cambridge, UK.

Rai P.K., 2009. Heavy metal phytoremediation from aquatic ecosystems with special reference to macrophytes. Critical Rev Environ Sci Technol 39(9): 697 – 753.

Radic S., Stipanicev D., Cvjetko P., Marijanovic M.R., Sirac S., Pevalek-Kozlina B., Pavlica M., 2011. Duckweed *Lemna minor* as a tool for testing toxicity and genotoxicity of surface waters. Ecotoxicology and Environmental Safety 74: 182 – 187.

Sandermann H., 1994. Higher-plant metabolism of xenobiotics – the green liver concept. Pharmacogenetics 4: 225 – 241.

Schnoor J.L., Licht L.A., McCutcheon S.C., Wolfe N.L., Carrier L.H., 1995. Phytoremediation: An Emerging Technology for Contaminated Sites. In: Erickson L.E., Tillison D.L., Grant S.C., McDonald J.P., (Eds) Proceedings of 10th Annual Conference on Hazardous Waste Research. Great Plains/Rocky Mountain Hazardous Substance Research Center, Manhattan, Kansas, pp 221 - 222.

Shan M., Wang Y. & Shen X., 2009. Study on bioremediation of eutrophic lake. *Journal of Environment Sciences*: 21 (1): 16 – 18.

Slovin J., 1997. Phytotoxic conjugates of indole-3-acetic acid: Potential agents for biochemical selection of mutants in conjugate hydrolysis. Plant Growth Reg. 21: 215 – 221.

Jain S. K., Vasudevan P., Jha. N. K., 1989. Removal of Some Heavy Metals From Polluted Water by Aquatic Plants: Studies on Duckweed and Water Velvet, *Biol. Wastes*, 28: 115 – 126.

Susarla S., Medina V.F., McCutcheon S.C., 2002. Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. *Ecol Eng* 18: 647 – 658.

Teixeira S., Vieira M.N., Espinha Marques J., Pereira R., 2013. Bioremediation of an iron-rich mine effluente by *Lemna minor*. *International Journal of Phytoremediation*, Publicado on-line.

Toro G.I., Ramirez Leather G.R., Einhellig F.A., 1988. Effects of three phenolic compounds on *Lemna gibba* G3. *J. Chem. Ecol.* 14: 845 - 852.

Tu S., Ma L., Luongo T., 2004. Root exudates and arsenic accumulation in arsenic hyperaccumulating *Pteris vittata* and non-hyperaccumulating *Nephrolepis exaltata*. *Plant and Soil* 258: 9 – 19.

Uysal Y., Taner F., 2010. Bioremoval of Cadmium by *Lemna minor* in Different Aquatic Conditions. *Clean – Soil, Air, Water* 38(4): 370 – 377.

Varga M., Horvatic J., Celic A., 2013. Short term exposure of *Lemna minor* and *Lemna gibba* to mercury, cadmium and chromium. *Centr. Eur.J.Biol.* 8(11): 1083 – 1093.

Wang W., Williams J.M., 1990. The use of phytotoxicity tests (common duckweeds, cabbage, and millet) for determining effluent toxicity. *Environ. Monit. Assess.* 14: 59 - 69.

Zar J., 2010. *Biostatistical Analysis*, 5ª Edição. Pearson Prentice Hall, 947 pp.

CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DO USO POTENCIAL DA CORTIÇA COMO ADSORVENTE NO TRATAMENTO DE ÁGUAS RUÇAS

1. Introdução

A bioissorção é um processo físico-químico que envolve a separação de um contaminante que está numa fase fluida através da utilização de uma fase sólida constituída por material de origem biológica (Fu e Wang, 2011). A remoção dos contaminantes da solução aquosa é independente do metabolismo e pode ocorrer por adsorção física ou através da formação de complexos entre os contaminantes e os grupos funcionais da biomassa possibilitando a remediação da solução (Farooq *et al.*, 2010).

A biomassa, geralmente morta, utilizada como sorvente é normalmente e preferencialmente abundante na natureza ou é um resíduo ou subproduto resultante da atividade agrícola ou industrial. Este material tem geralmente pouco valor comercial e a sua utilização na depuração e tratamento de efluentes apresenta vantagens comparativamente a outras opções tecnológicas que requerem elevado investimento de capital (Fiol *et al.*, 2003), assim como contribuem para a valorização destes materiais que de outro modo seriam considerados como resíduos.

A seleção dos biomateriais permanece o maior desafio e deve ser baseada na sua origem, tipo e composição química e na composição da solução a purificar. As propriedades de sorção de um adsorvente, tais como a sua capacidade, podem ser melhoradas ou modificadas por diversos pré-tratamentos ou alterações técnicas (Vasconcelos e González-Beça, 1997; Kapoor e Viraraghavan, 1998). A otimização do método de bioissorção deverá ser iniciada pela escolha ou desenvolvimento de um adsorvente seletivo para o contaminante que se pretende remover (Chubar *et al.*, 2004).

A bioissorção é essencialmente utilizada na remoção e tratamento de metais em águas residuais (Villaescusa *et al.*, 2002; Fiol *et al.*, 2003) mas poderá ser considerada uma tecnologia promissora na remoção de poluentes orgânicos (Ariana *et al.*, 2012).

A cortiça é um material de origem vegetal que provém da casca (súber) do sobreiro (*Quercus suber* L.) que é periodicamente colhida da árvore, normalmente a cada 9-12 anos dependendo da região de cultura (Silva *et al.*, 2005). O sobreiro cresce maioritariamente na região Mediterrânea onde ocorrem as condições climáticas ideais para a espécie: abundante luz solar e a combinação de baixa pluviosidade e alguma humidade (verões secos e invernos temperados) (Barberis *et al.*, 2003).



Figura 33. Sobreiro

(http://2.bp.blogspot.com/_lqnfljCYf0/S9HJ3BSKGZI/AAAAAAAAABc/X5A06ZuyMsM/s1600/sobreiro%5B1%5D.jpg, acesso no dia 21 de setembro de 2013 retirado da net)

O sobreiro apresenta a vantagem de ser a única árvore cujo súber consegue regenerar depois de retirado, tornando-o um recurso renovável, e a cortiça um material amigo do ambiente (Fernandes *et al.*, 2010).

A constituição química da cortiça tem sido largamente estudada e depende de fatores tais como origem geográfica, condições climáticas, tipo de solo, dimensões da árvore, idade (virgem ou reprodutora) e condições de crescimento. A estrutura celular da parede da cortiça consiste principalmente em suberina e lenhina, constituintes orgânicos polissacarídicos (celulose e hemicelulose), e extraíveis (ceras e taninos) (Bento *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2005). O conteúdo mineral é baixo, sendo o cálcio o elemento mais abundante, seguido pelo fósforo, ferro, magnésio e alumínio (Pereira, 1988; Chubar *et al.*, 2004).

A cortiça possui uma combinação única de propriedades devido à sua estrutura celular e composição química (Conde *et al.*, 1998), tais como coeficiente de fricção elevado, resiliência, impermeabilidade a líquidos, condutividade térmica baixa, baixa densidade, energia de adsorção elevada, excelentes propriedades de isolamento, coeficiente de Poisson perto de zero, resistência ao fogo entre outras (Pereira, 1988; Fernandes *et al.*, 2010).

A cortiça possui uma ampla gama de aplicações, mas a utilização tradicional para produção de rolhas de garrafas de vinho representa a maior percentagem, com cerca de 58% de vendas em 2010 na maior corticeira de Portugal e do mundo (Corticeira Amorim, 2011). Durante a produção das rolhas é obtida uma cortiça granulada de diferentes granulometrias e densidades que pode ser usada em diversas aplicações tais como incorporação em aglomerados e briquettes, substrato agrícola, agente de enchimento (Gil, 1997), remoção de poluentes por bioissorção e produção de carvões ativados (Silva *et al.*, 2005).

Por ser um material de baixo custo e amigo do ambiente tem sido usado comercialmente como absorvente de derramamentos de óleos (Corticeira Amorim, 2009). É igualmente um bioissorvente promissor na remoção de metais em pequenas concentrações em águas e águas residuais, uma vez que os métodos tradicionais de precipitação química e osmose inversa são pouco eficazes, e a adsorção com resinas poliméricas, carvões ativados ou alumina ativada são demasiado caros (Villaescusa *et al.*, 2002; Fiol *et al.*, 2003).

A cortiça granulada também tem sido utilizada como bioissorvente de outros poluentes, nomeadamente orgânicos, tais como compostos fenólicos voláteis (Karbownik *et al.*, 2010), paracetamol (Villaescusa *et al.*, 2011) e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Olivella *et al.*, 2011a). A interação da cortiça com os poluentes orgânicos, que são essencialmente hidrofóbicos, pode ser explicada pela estrutura, principalmente aromática da suberina e lenhina. Por ser hidrofóbica apresenta a vantagem de possuir afinidade sobre outros materiais naturais na remoção de poluentes orgânicos (Domingues *et al.*, 2007). Embora a cortiça remova poluentes orgânicos em pequenas concentrações, os estudos existentes que de fato o comprovem são ainda muito poucos.

As partículas de cortiça têm igualmente sido usadas como bioissorventes de piretóides em colunas de adsorção (Domingues, 2005) e como suporte para biofilmes na degradação de compostos orgânicos voláteis (COV's) (Kwon e Cho, 2009).

Os carvões ativados derivados do pó de cortiça têm diversas aplicações no tratamento de águas, águas residuais e efluentes gasosos. A sua aplicação é escolhida em função das suas propriedades superficiais e afinidade, e a eficiência de remoção depende das propriedades do adsorvente e da sua interação com o poluente alvo. As aplicações descritas na literatura são essencialmente relativas a poluentes aquáticos emergentes, como produtos farmacêuticos, compostos fenólicos e compostos orgânicos voláteis, e que foram testados a partir de soluções e não diretamente em efluentes reais (Mourão *et al.*, 2006; Cardoso *et al.*, 2008; Mestre *et al.*, 2007, 2009).

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo geral avaliar a capacidade da cortiça de atuar como adsorvente para melhorar as propriedades químicas das águas ruças, combinando deste modo dois subprodutos resultantes de duas atividades económicas importantes no país: a produção de cortiça e a produção de azeite. Como objetivos específicos pretendeu-se avaliar qual o tempo ideal de contacto entre a cortiça e o efluente, assim como as condições de exposição.

2. Material e Métodos

2.1. Caracterização do efluente e do granulado de cortiça

Para os ensaios foram utilizadas águas ruças recolhidas de um lagar de azeite localizado no concelho de Lamego, Portugal. O processo de produção de azeite deste lagar é de duas fases, e as águas resultantes do processo produtivo (águas ruças) são apenas corrigidas quimicamente com cal e armazenadas em tanques de sedimentação, ao ar livre, até nova campanha de produção de azeite.

As amostras foram recolhidas em outubro e novembro de 2012 sendo referente ao processo produtivo do ano de 2011. As amostras utilizadas nos ensaios foram conservadas a 4°C.

Uma sub-amostra filtrada, em filtro de fibra de vidro de 1,2 μ (GF/C 47 mm; Cat no 1822-047 Whatman) deste efluente bruto foi congelada à chegada ao laboratório, para posterior caracterização físico-química e determinação de pH, cor, carência química de oxigénio (CQO) e índice fenólico.

O efluente concentrado de lagar de azeite foi testado com 2 granulados de cortiça com granulometrias diferentes (Figura 34). Consideramos o granulado 1, o granulado expandido de diâmetro compreendido entre 0,5 e 1 mm. O granulado 2 apresenta um diâmetro entre 3-5 mm. Os granulados 1 e 2 utilizados nos ensaios foram obtidos ao longo do processo industrial de produção da cortiça, em que esta é submetida a um tratamento térmico com vapor de água a 400 °C, e foram recolhidos nas fases de corte e trituração (informação fornecida pela Corticeira Amorim).



Figura 34. Granulados utilizados no ensaio: (1) granulado 1, (2) granulado 2.

2.2. Ensaio preliminar com cortiça para tratamento de águas ruças

Este ensaio preliminar foi realizado com o objetivo inicial de saber qual o tempo de exposição da cortiça ao efluente para que a extração fosse máxima, e também qual o granulado mais eficiente no processo.

Os ensaios foram realizados em copos de vidro (para reduzir a adsorção de compostos orgânicos às paredes do recipiente) de 500 mL, tendo-se colocado 5 g de cada granulado de cortiça (pesado em balança de precisão 0,01g) em 100 mL de água ruça (1:20 m/v). Foram preparadas 3 réplicas independentes para as 12, 24, 48 e 72 horas de exposição do efluente à cortiça, e 2 controlos, cada um com 3 réplicas, de efluente de lagar de azeite sem cortiça, e outro apenas com cortiça em água destilada. O ensaio decorreu no laboratório à temperatura ambiente. O peso de granulado a utilizar nos ensaios foi baseado numa ficha de um granulado comercializado pela Corticeira Amorim, recomendado para derrames de óleos, e que consiste na proporção de 9,43 litros de óleo por kg de adsorvente (1:10 m/v). Contudo usou-se apenas metade desta proporção, devido ao facto de o granulado ocupar muito volume. (<http://www.corksorb.com/index.php?id=175>). Os ensaios foram realizados sem agitação contínua, apenas com agitação manual ocasional.

No final de cada período de exposição filtrou-se o efluente com gaze e determinou-se para cada réplica o pH e a condutividade pelo método potenciométrico, usando um medidor portátil marca HANNA HI 991300 devidamente calibrado.

As amostras finais de efluente foram refrigeradas a 4°C e posteriormente a cor foi determinada pelo método colorimétrico de platina-cobalto num fotómetro marca HANNA C200.

Foi feita a determinação do volume ocupado por cada granulado no início e no final de cada ensaio. O volume foi determinado num recipiente cilíndrico, tendo sido medida a sua altura e diâmetro para aplicação da fórmula matemática ($V = \pi r^2 \times h$);

2.3. Ensaio final com cortiça e agitação contínua

Este ensaio teve como objetivo testar a eficácia do granulado de cortiça na bioissorção de compostos orgânicos das águas ruças, alterando algumas variáveis relativamente ao ensaio preliminar, nomeadamente: o tempo de exposição, a agitação e a pré-lavagem do granulado.

Assim, os dois granulados foram previamente sujeitos a uma pré-lavagem que consistiu em 2 lavagens sucessivas com água da torneira, seguidas de 3 lavagens com água destilada. Posteriormente, os granulados foram mergulhados em água destilada, durante 72 horas, sendo retirados da água, e colocados a secar na estufa a 40 °C, durante uma semana. No caso do granulado 1, verificou-se que mesmo manteve um pó residual após o pré-tratamento, o que não foi registado para o granulado 2. No final determinou-se o volume inicial, da massa dos dois granulados secos a utilizar nas réplicas do ensaio, introduzindo-os num recipiente cilíndrico, sem compactar, e aplicando a fórmula matemática ($V = \pi r^2 \times h$).

Com base nos resultados do ensaio preliminar, o tempo de exposição neste ensaio foi incrementado para 144 horas. Manteve-se a quantidade de granulado de 5 g para 100 mL de águas ruças em cada réplica, num total de quatro réplicas por tratamento (efluente + granulado). Prepararam-se ainda 4 réplicas para o controlo com efluente e para o controlo dos dois granulados com água destilada. Os ensaios foram realizados em copos de vidro tapados com película transparente de modo a evitar a evaporação do efluente ou da água destilada, e mantidos num agitador orbital (marca Gesellschaft fur Labortechnik mbH D 30938), durante 144h, a 90 rpm. O pH inicial e a condutividade de cada réplica foram determinados com recurso a um medidor portátil (HANNA HI 991300).

No final de cada ensaio filtrou-se o efluente de cada réplica com um filtro de café comercial, determinou-se o pH, condutividade e a cor segundo métodos descritos no ensaio preliminar. O volume de amostra remanescente de cada réplica foi congelado para posterior determinação da CQO e índice fenólico. A CQO foi determinada pela adaptação do método aprovado pela EPA 410.4 (Environmental Protection Agency, 1993), em que a

amostra é digerida na presença de dicromato de potássio a 150 °C, durante 2 horas, com recurso aos kits de marca HANNA HI 93754B-25 Gama média (0 – 1500 mg/L), utilizando um digestor C9800 da HANNA Instruments. A leitura final da CQO foi realizada num fotómetro multiparamétrico C214 da mesma marca.

Para determinação do índice fenólico foi seguido o método fotométrico de fenóis, utilizando para o efeito o Kit da NanoColor Test 0-74 (0,2 – 5 mg/L), sendo a leitura posteriormente efetuada no fotómetro NanoColor 500D.

Foi feita a medição do volume final de cada granulado, para cada uma das réplicas, seguindo a metodologia descrita anteriormente.

2.4. Análise química do efluente

As amostras de águas ruças (40 mL por repetição) foram submetidas à extração líquido-líquido na proporção de 40 mL de amostra e 25 mL de éter dietílico misturados num funil de separação. Após repouso a camada superior foi recolhida por aspiração. A extração foi repetida mais duas vezes com 25 mL de éter dietílico e 25 mL de acetato de etilo, respetivamente. Todos os extratos orgânicos foram filtrados através de sulfato de sódio, recolhidos num balão de 100 mL em forma de pêra e colocados num evaporador rotativo, a 45 °C, até atingirem um volume de 0,5 mL, mantidos posteriormente sob azoto gasoso até secar. As amostras secas foram redissolvidas com 3 mL de éter dietílico e transferidas para um microtubo. Às amostras resultantes adicionaram-se 250 µL de piridina (Fluka, Espanha), 250 µL de bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (Fluka, Espanha), e 50 µL de clorotrimetilsilano (Sigma-Aldrich, Alemanha) e, mantendo-se de seguida a mistura num banho de areia (70 °C, 30 min) .

Para a quantificação dos compostos orgânicos os extratos de amostras foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS num Shimadzu QP5000), usando uma coluna capilar (SPB-5, 30 m x 0,32 mm, 0,25 mm de espessura de filme, Supelco, Espanha) (Justino *et al.*, 2009; Duarte *et al.*, 2012). O GC-MS foi operado em modo de monitorização seletiva de iões. O injetor foi mantido a uma temperatura de 250 °C e usou-se o seguinte programa de temperaturas: de 80 °C a 220 °C com uma velocidade de 3 °C minuto⁻¹, seguido de 220 °C a 290 °C com uma velocidade de 6 °C minuto⁻¹, permanecendo a 290 °C durante 3,09 minutos. O gás de arraste utilizado foi o hélio, com o seguinte programa de pressões: pressão inicial de 50 kPa durante 1 min, seguido de 90 kPa (1,5 kPa 1 minuto) e em seguida a 110 kPa (0,7 kPa, 1 minuto). A

concentração de cada composto foi determinada por interpolação direta nas curvas de calibração dentro da sua gama de resposta linear, e os limites de deteção foram calculados utilizando a fórmula: $y = y_B + 3s_B$, onde s_B é o desvio padrão do sinal do branco estimado como $S_{Y/X}$, o desvio padrão residual é retirado a partir da linha de calibração, e y_B é o sinal do branco estimado a partir da interceção (Miller e Miller, 2005).

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização do efluente bruto do ensaio preliminar

Nas tabelas 2.1 e 2.2 são apresentados os resultados obtidos na caraterização química do efluente bruto filtrado para o ensaio preliminar com a cortiça.

Tabela 2.1 – Caraterização química das águas ruças do ensaio preliminar com a cortiça.

Parâmetros	Média (µg/L)
Ácido mirístico	32,3 ± 0,86
Ácido palmítico	98,0 ± 0,40
Ácido linoleico	112,3 ± 0,4
Ácido oleico	326,7 ± 0,85
Ácido esteárico	40,4 ± 0,25
Ácido α-linolénico	23,5 ± 0,40
Ácido lignocérico	27,5 ± 0,35
β-sitosterol	40,5 ± 0,2
Catecol	73,5 ± 0,40
Tirosol	80,4 ± 0,26
Ácido vanílico	23,7 ± 0,25
Ácido p-cumárico	71,6 ± 0,21
Ácido cafeico	85,4 ± 0,3

Os valores médios obtidos para os compostos orgânicos das águas ruças utilizadas no ensaio, são da mesma ordem de grandeza do que está descrito pela literatura existente, sobretudo nos casos em que da mesma forma ocorreu armazenamento em tanques das águas ruças sem diluição (Duarte *et al.*, 2012) e muito superiores em comparação ao efluente que embora tenha sido armazenado em tanques foi sujeito a diluição (Justino *et al.*, 2009). A toxicidade das águas ruças deve-se segundo diversos autores (Greca *et al.*, 2001; Fiorentino *et al.*, 2003; Isidori *et al.*, 2005) à presença de compostos fenólicos como

(o tirosol, o ácido cumárico, o ácido vanílico e o ácido cafeico), compostos estes que estão presentes no efluente testado neste trabalho.

Tabela 2.2 – Caraterização química das águas ruças do ensaio preliminar com a cortiça

Parâmetros / unidades	
pH	6,18
Cor ^a (Pt-Co)	2637
CQO ^a (mg/L)	672
Índice fenólico ^a (mg/L)	4,8

^a amostra filtrada e congelada

O valor de pH obtido é ligeiramente superior aos valores encontrados na bibliografia, que se caracterizam normalmente por valores de pH inferiores a 6 (Justino *et al.*, 2012). Os níveis de CQO e índice fenólico deste efluente foram igualmente inferiores aos documentados (Duarte *et al.*, 2012; Justino *et al.*, 2012), supõem-se que isto resulte do facto destes parâmetros terem sido determinados após a filtração do efluente bruto. Os valores de cor descritos na bibliografia foram determinados por um método diferente do realizado neste trabalho, não permitindo uma comparação direta com dados pré-existentes (Khoufi *et al.*, 2007; Amaral *et al.*, 2012).

3.2. Ensaio preliminar com a cortiça para tratamento de águas ruças

No final do ensaio para os diferentes tempos testados não foram detetadas alterações visíveis no aspeto final do efluente bruto (figura 35). O facto de o ensaio se ter realizado sem agitação, leva a suspeitar que não ocorreu um contacto estreito entre a cortiça e o efluente, o que terá reduzido a eficácia do processo de adsorção.

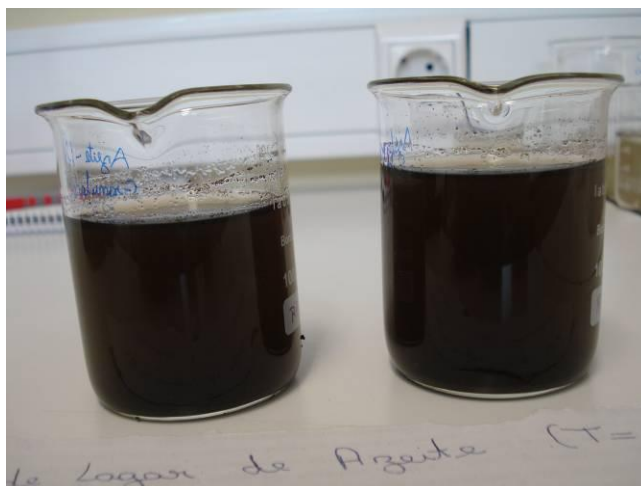


Figura 35. Aspeto final do efluente exposto ao contacto com os granulados 1 e 2 durante 12 horas, apenas com agitação manual ocasional.

Os controlos de cortiça com água destilada, (Figura 36), para ambos os granulados, permitiram verificar que a cortiça liberta para a água um resíduo fino. Este facto ocorreu independentemente do tempo de exposição. Isto levou a concluir sobre a importância de efetuar uma lavagem prévia dos granulados

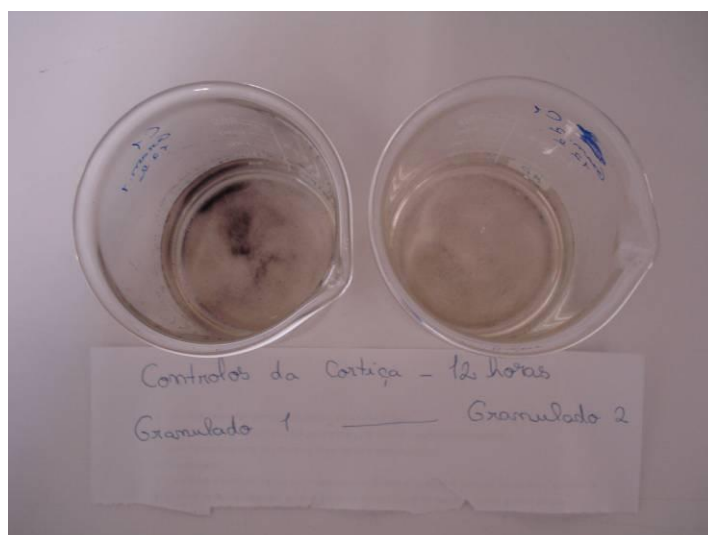


Figura 36. Controlo dos ensaios com granulados 1 e 2 com água destilada após filtração para o tempo de 12 horas.

Assim, apenas são apresentadas algumas imagens dos tempos ensaiados porque os resultados visuais, acima descritos foram iguais quer para os controlos dos granulados, quer para o efluente de lagar de azeite testado com os diferentes granulados nos diferentes tempos de ensaio.

Nas tabelas A-II-1 e A-II-2 do Anexo II são apresentados os resultados obtidos para o volume de granulado, pH, condutividade e cor para os diferentes tempos de ensaio e diferentes granulados.

No que refere aos parâmetros químicos do efluente (pH, cor e condutividade) a análise de variância de duas vias registou a ocorrências de diferenças significativas entre tratamentos, para ambos os granulados (Tabela 2.3). No que refere às diferenças entre tempos de exposição, estas apenas foram registadas para o pH e a condutividade do efluente. A interação entre os fatores tempo de exposição e tratamento foi sempre significativa, o que significa que as diferenças entre os tratamentos dependerá dos tempos de exposição à cortiça. Tal ocorrência apenas não se registou para a cor no ensaio com granulado 2 (Tabela 2.3). No que refere ao volume do granulado, não se observaram diferenças significativas entre tratamentos, mas apenas entre tempos de exposição, quer para o granulado 1, quer para o 2.

Tabela 2.3. Resultados da análise de variância de duas vias efetuadas aos parâmetros do efluente e ao volume do granulado para testar o efeito do tratamento e do tempo de exposição. A bold destaca-se efeito não significativo do fator testado.

	F	P	g.l.
pH - Granulado 1			
Tratamento	142,5	p<0,001	2, 35
Tempo de Exposição	48,1	p<0,001	3, 35
Tratamento X Exposição	89,4	p<0,001	6, 35
pH - Granulado 2			
Tratamento	128,0	p<0,001	2, 35
Tempo de Exposição	34,2	p<0,001	3, 35
Tratamento X Exposição	138,2	p<0,001	6, 35
Cor – Granulado 1			
Tratamento	70,87	p<0,001	2, 35
Tempo de Exposição	2,24	p=0,108	3, 35
Tratamento X Exposição	3,96	p=0,006	6, 35
Cor – Granulado 2			
Tratamento	75,0	p<0,001	2, 35
Tempo de Exposição	0,81	p=0,499	3, 35
Tratamento X Exposição	1,46	p=0,235	6, 35
Condutividade – Granulado 1			
Tratamento	10033,82	p<0,001	2, 35
Tempo de Exposição	35,54	p<0,001	3, 35
Tratamento X Exposição	17,92	p<0,001	6, 35
Condutividade – Granulado 2			
Tratamento	1647,31	p<0,001	2, 35
Tempo de Exposição	5,80	p<0,001	3, 35
Tratamento X Exposição	7,75	p<0,001	6, 35
Volume – Granulado 1			
Tratamento	2,52	p=0,131	1, 23
Tempo de Exposição	7,08	p=0,003	3, 23
Tratamento X Exposição	11,74	p<0,001	3, 23
Volume – Granulado 2			
Tratamento	1,92	p=0,184	1, 23
Tempo de Exposição	9,20	p<0,001	3, 23
Tratamento X Exposição	9,20	p<0,001	3, 23

A variação de pH nos ensaios realizados pode ser visualizada graficamente para os granulados 1 e 2, nas figuras 37 e 38. Como é possível observar, o efluente tratado com a cortiça sofreu uma diminuição significativa do pH, para valores mais próximos da neutralidade, ou até ligeiramente ácidos, em praticamente todos os tempos de exposição (exceto 48h), e para ambos os granulados. As variações de pH entre os tempos de exposição, para cada um dos tratamentos, reveladas pelas análises de variância de uma via foram sempre muito significativas (p<0,001) para os ensaios com os dois granulados. Contudo, o aspeto interessante que esta análise mostra é que a diminuição significativa

que ocorreu no pH do efluente, tratado com cortiça (granulado 1 e 2), não terá sido causada apenas pela cortiça, mas possivelmente por processos de oxidação que ocorreram no efluente, uma vez que no controlo com efluente também se registou uma diminuição muito significativa de pH ($p < 0,001$) para tempos de exposição acima das 48h. Ambos os granulados de cortiça mostram, por oposição, alguma tendência para fazer aumentar o pH do meio onde se encontram, na medida em o valor de pH foi significativamente mais elevado ($p < 0,05$), após 48h de exposição, no controlo de cortiça com água destilada, comparativamente aos restantes tempos de exposição. No processo de bioissorção, o pH é um fator determinante devido à competição que pode ocorrer entre os centros ativos da cortiça e os iões H^+ (Mota *et al.*, 2006). A curva de titulação potenciométrica da cortiça, utilizada para estudar as propriedades de permuta iónica da mesma é semelhante a uma curva típica de superfícies acídicas fracas devido provavelmente à presença de grupos carboxílicos. A carga negativa na superfície da cortiça aumenta com o aumento da alcalinidade das soluções, sendo este efeito causado certamente pela ionização dos grupos carboxílicos e com a libertação de hidrogeniões para a solução (Chubar *et al.*, 2004). Tal facto pode também justificar a diminuição de pH do efluente tratado, ainda que como referimos não terá sido este, o único processo. Não obstante esta diminuição a análise de variância de uma via, efetuada para comparar tempos de exposição, dentro de cada tratamento, seguida do teste de Tukey de comparações múltiplas demonstrou que o pH do efluente tratado diminuiu significativamente após 12h de exposição, mas voltou a aumentar para níveis semelhantes aos iniciais, após 72h (G1: $F=67,0$; d.f. 8,11; $p < 0,001$; G2: $F=28,26$; d.f. 8,11; $p < 0,001$).

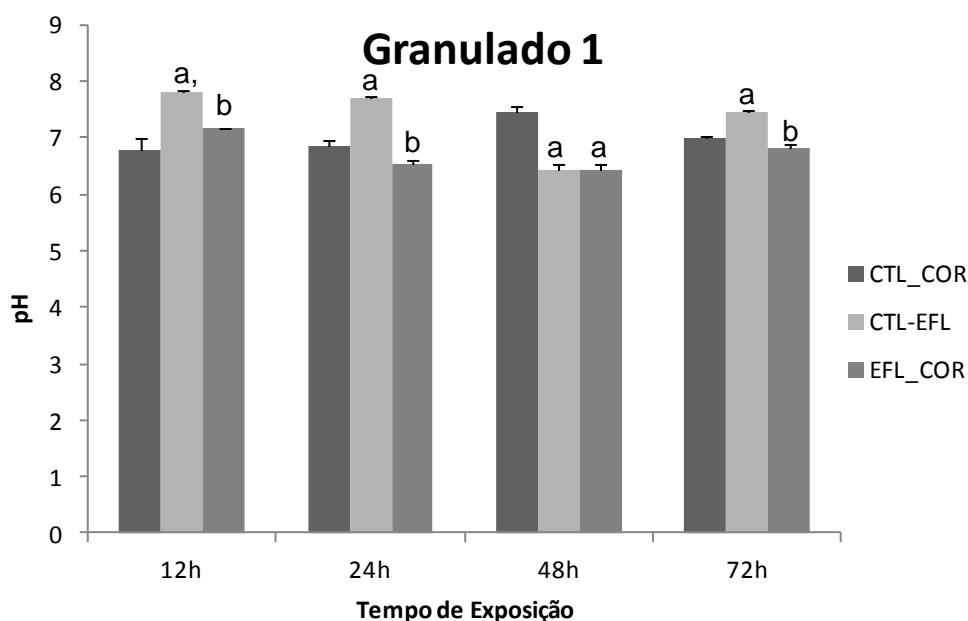


Figura 37. Variação do pH no ensaio realizado com o granulado 1 de cortiça. As barras de erro representam o desvio padrão e as letras representam diferenças significativas entre o controlo de efluente e o efluente tratado com cortiça, em cada um dos tempos de exposição. As letras representam diferenças significativas entre tratamentos, para cada um dos tempos de exposição ($p < 0,05$).

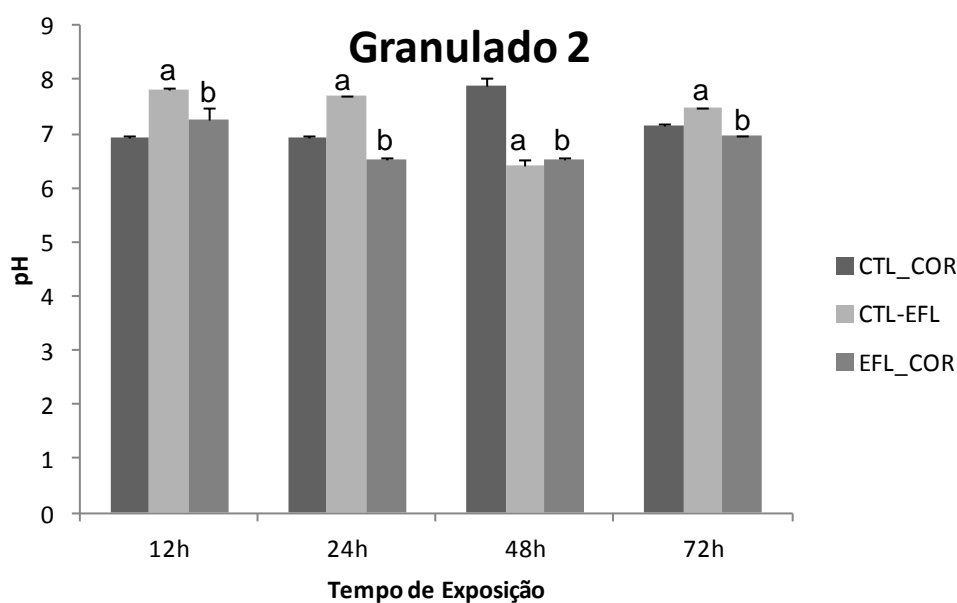


Figura 38. Variação do pH nos ensaios realizados com o granulado 2 de cortiça. As barras de erro representam o desvio padrão e as letras representam diferenças significativas entre o controlo de efluente e o efluente tratado com cortiça, para cada um dos tempos de exposição. As letras representam diferenças significativas entre tratamentos, para cada um dos tempos de exposição ($p < 0,05$).

No que refere à cor do efluente, a análise de variância de duas vias voltou a ser repetida, desta vez retirando o CTL de cortiça com água destilada, da mesma, na medida em que os valores registados para este tratamento estavam a forçar as diferenças entre

tratamentos. E, após a repetição, verificou-se que as diferenças significativas entre tratamentos com granulado 1 mantiveram-se ($F=5,49$; d.f. 1, 23; $p=0,03$), mas entre tempos de exposição continuaram a não ser registadas ($F=2,25$; d.f. 3, 23; $p=0,122$). Contudo a interação entre os dois fatores foi significativa o que demonstra que as diferenças entre tratamentos mesmo assim dependem do tempo de exposição em que são analisadas. Para o granulado 2 não houve qualquer efeito ($p>0,05$) significativo dos dois fatores na cor do efluente. Pela análise da figura 48, é possível verificar que a partir das 12h houve uma tendência para a cor do efluente tratado com cortiça diminuir, contudo essa diminuição só foi significativa após as 48h de exposição do efluente à cortiça ($F=24,37$; d.f. 4,5; $p=0.007$). Após 72 h de exposição a situação inverte-se e houve um aumento da cor do efluente tratado com cortiça, o que sugere que poderá ter havido de novo uma mobilização de compostos que estariam adsorvidos à cortiça, para a água. O aumento de cor verificado a partir das 72 h é coincidente com o aumento de pH após este tempo de exposição o que poderá ser explicado pela menor capacidade de adsorção para pH mais elevados e uma vez que o equilíbrio de bioissorção de poluentes orgânicos na cortiça é atualmente atingido em 20-48 h (Domingues, 2005; Domingues *et al.*, 2005; Villaescusa *et al.*, 2011). A análise de variância de uma via realizada para comparar individualmente a variação de cor dos controlos dos dois granulados entre os dois tempos de exposição, não registou variações significativas ($p>0,05$). Tal facto indica que ainda que haja mobilização de compostos da cortiça para a fase aquosa, essa mobilização ocorre logo numa fase inicial, conferindo alguma cor, mas não há um aumento com o tempo de contacto da cortiça com a solução.

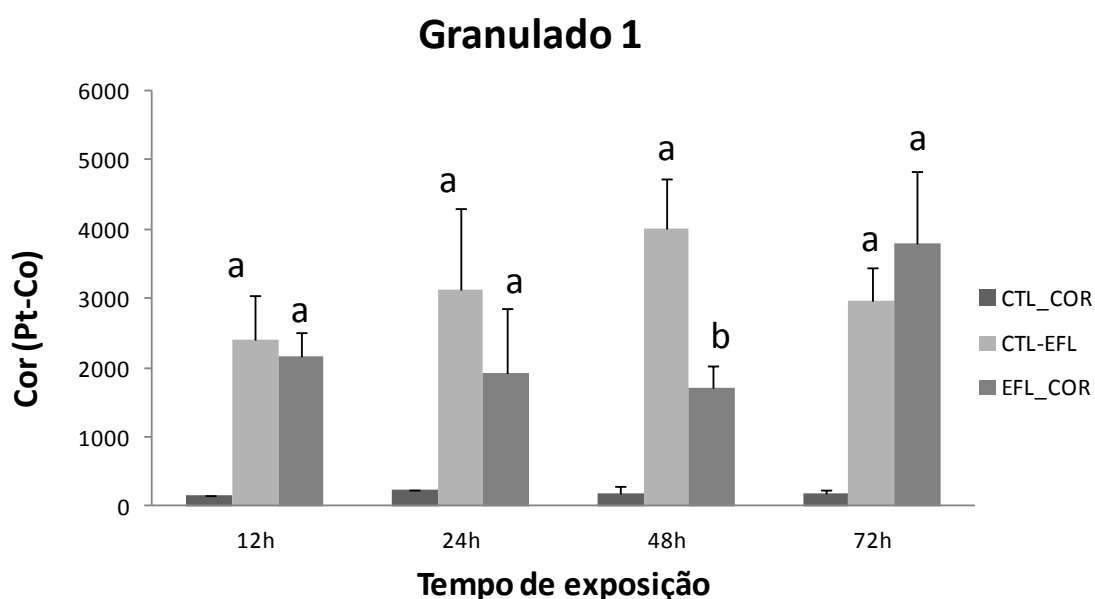


Figura 39. Variação da cor no ensaio realizado com o granulado 1 de cortiça. As barras de erro representam o desvio padrão e as letras representam diferenças significativas entre o controlo de efluente e o efluente tratado com cortiça, para cada um dos tempos de exposição. As letras destacam diferenças significativas entre tratamentos para cada tempo de exposição ($p < 0,05$).

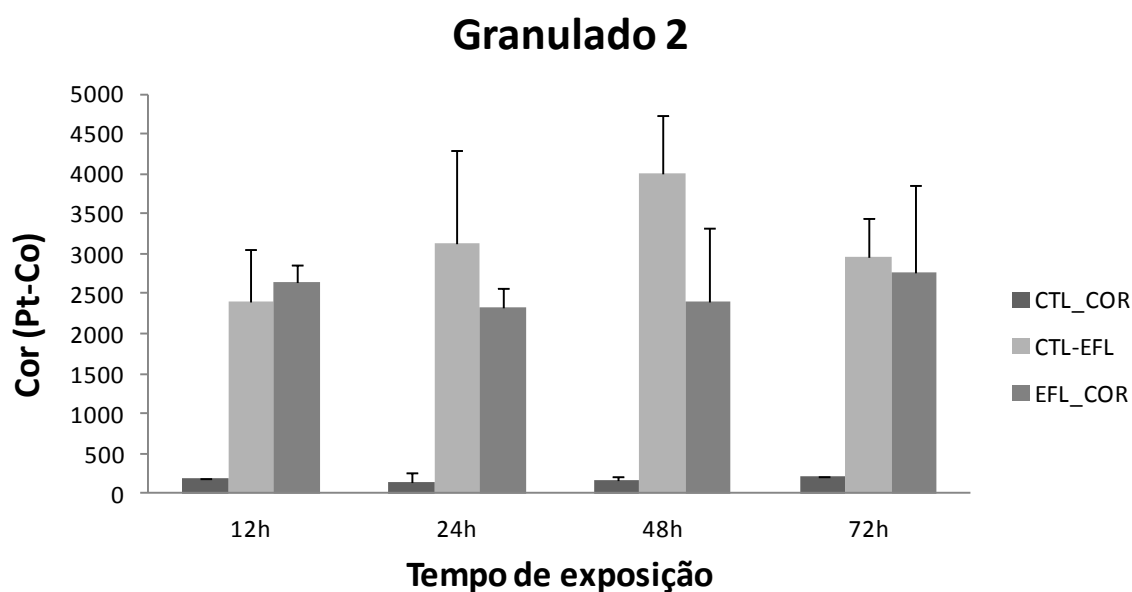


Figura 40. Variação da cor no ensaio realizado com o granulado 2 de cortiça. As barras de erro representam o desvio padrão.

O parâmetro condutividade é indicador do grau de poluição de um efluente. Para o parâmetro condutividade seguiu-se o mesmo procedimento descrito em cima para a cor, repetindo a análise de variância de duas vias, sem o controlo de água destilada com cortiça. Esta segunda análise demonstrou a não existência de diferenças significativas da condutividade do efluente entre tratamentos com os dois granulados (Granulado 1: $F=2,4$;

d.f. 1, 23; $p=0,172$; Granulado 2: $F=0,06$; d.f. 1,23; $p=0,802$), mas apenas entre tempos de exposição (Granulado 1: $F=25,42$; d.f. 3, 23; $p<0,001$; Granulado 2: $F=28,43$; d.f. 3, 23; $p<0,001$), assim como uma interação significativa entre os dois fatores (Granulado 1: $F=18,96$; d.f. 3,23; $p<0,001$; Granulado 2: $F=11,84$; d.f. 3,23; $p<0,001$). A análise de variância de uma via realizada para cada um dos tratamentos demonstrou que houve uma variação significativa da condutividade no controlo apenas com efluente entre tempos de exposição ($F=31,82$; d.f. 8, 11; $p<0,001$) resultante do aumento significativo da condutividade após as 72h de exposição (Figura 41). Para o efluente tratado com o granulado 1 de cortiça houve igualmente diferenças significativas entre tempos de exposição ($F=5,69$; d.f. 8, 11; $p=0,023$). Comparando os tempos de exposição verificou-se que esta diferença resultou apenas de um ligeiro aumento da condutividade do efluente após as 48h de exposição, comparativamente às 24h. Para o granulado 2, ainda que a tendência tenha sido a mesma, não se registaram diferenças significativas da condutividade entre tempos de exposição ($p>0,05$).

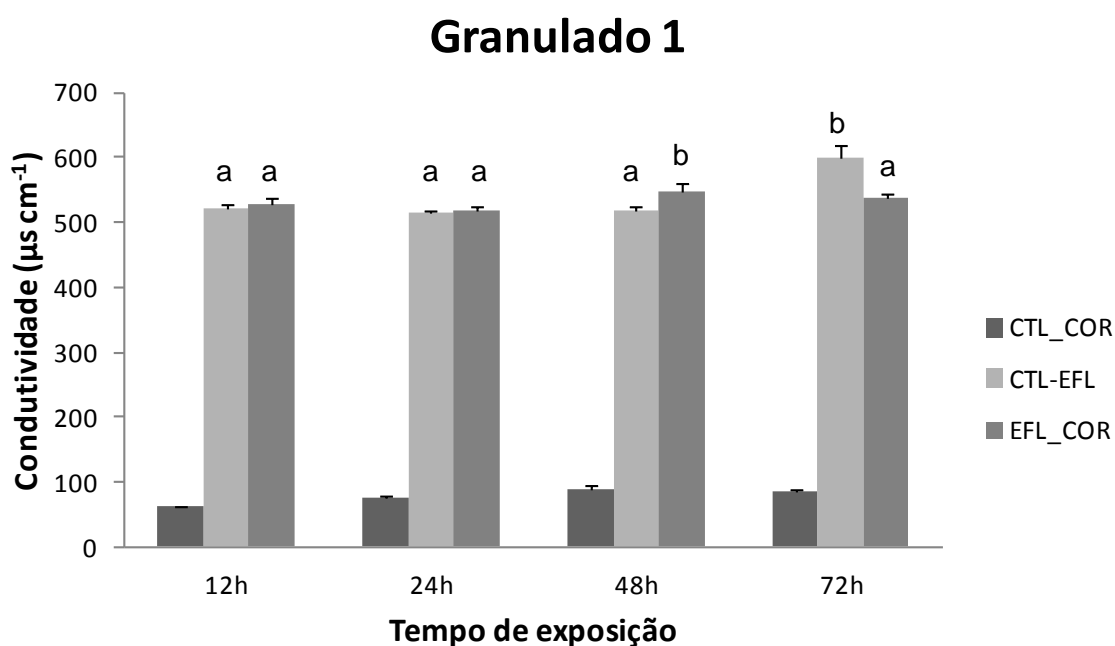


Figura 41. Variação da condutividade no ensaio realizado com o granulado 1 de cortiça. As barras de erro representam o desvio padrão. Letras representam diferenças significativas entre tempos, dentro de cada tratamento.

Granulado 2

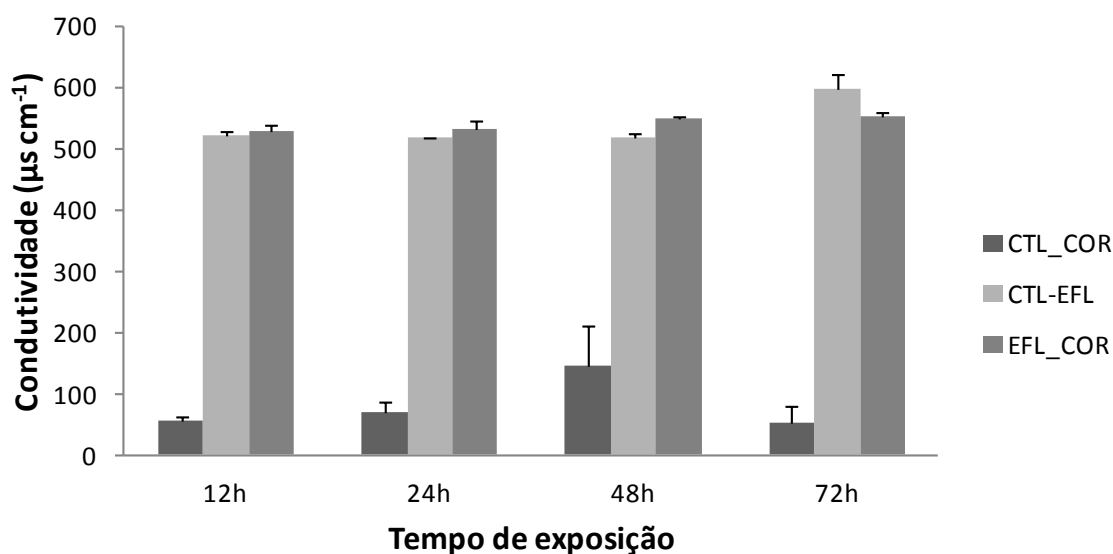


Figura 42. Variação da condutividade no ensaio realizado com o granulado 2 de cortiça. As barras de erro representam o desvio padrão.

As variações de volume médio dos dois granulados registadas ao longo do tempo nos dois tratamentos com cortiça, estão representadas nas figuras 43 e 44. Assim, e como é possível observar na tabela 2.3., para ambos os granulados, não se registaram diferenças significativas entre tratamentos, mas apenas entre tempos de exposição, assim como uma interação significativa entre os fatores (tempo de exposição *versus* tratamento). Comparando, o volume de granulados entre tratamentos para cada um dos tempos de exposição é possível constatar que houve uma diminuição significativa do volume do granulado apenas às 48h ($p=0,006$) para o G1, e após as 12h ($p=0,013$) e as 72h ($p=0,024$) para G2, tal facto sugere que esta diminuição pode ter resultado da perda de água que estava integrada na estrutura da cortiça. De qualquer modo, o que estes resultados mostram é que em caso de utilização deste material para tratamento de efluentes, o seu volume não aumenta de forma significativa, o que corresponderia a um constrangimento em termos do destino final a dar-lhe, assim como não contribui para a perda de um volume significativo de água por absorção.

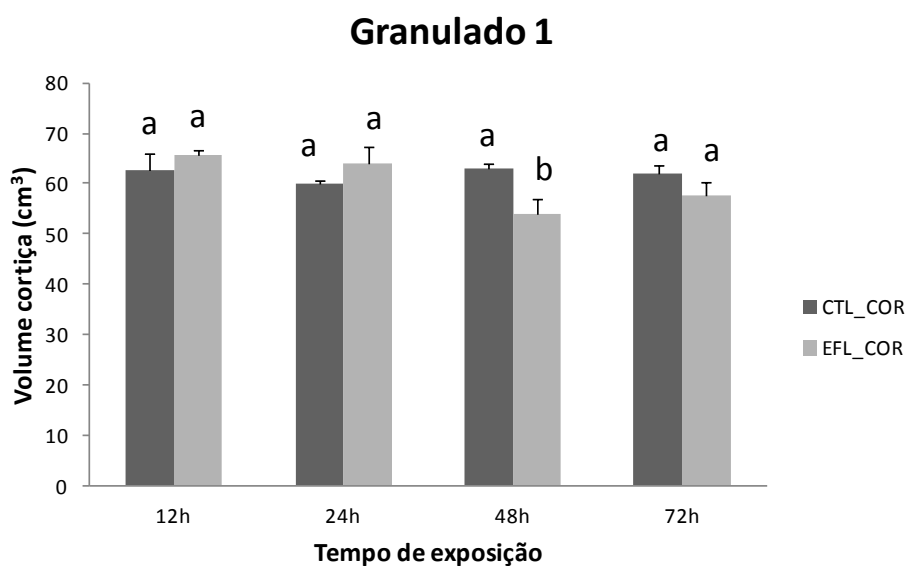


Figura 43. Variação do volume no ensaio realizado com o granulado 1 de cortiça. As barras de erro representam o desvio padrão e as letras representam diferenças significativas entre tratamentos para cada um dos tempos de exposição. As letras correspondem a diferenças significativas entre tempos de exposição para cada um dos tratamentos ($p < 0,05$).

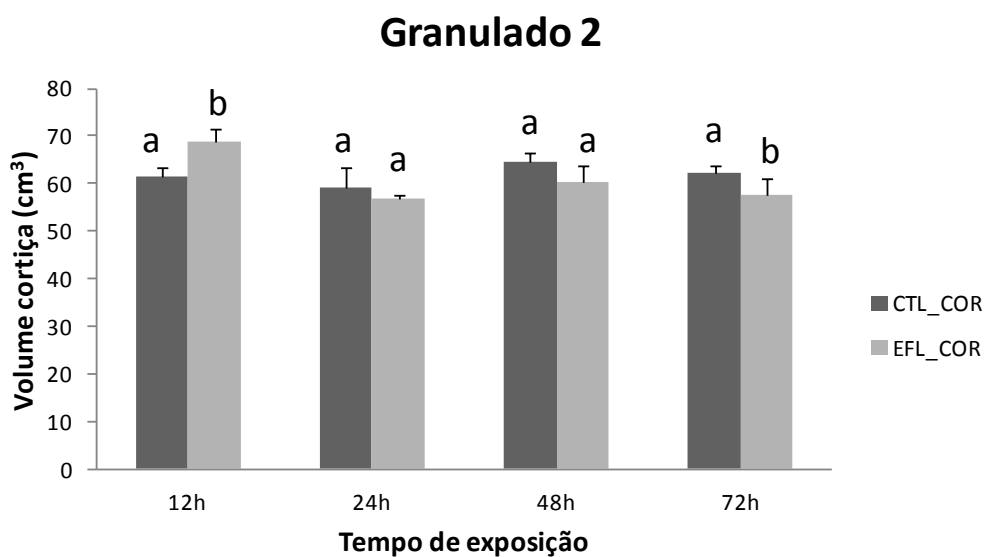


Figura 44. Variação do volume no ensaio realizado com o granulado 2 de cortiça. As barras de erro representam o desvio padrão e as letras representam diferenças significativas entre tratamentos para cada um dos tempos de exposição

3.3. Ensaio final com a cortiça e agitação contínua

3.3.1 Caraterização do efluente bruto do ensaio com agitação

Nas tabelas 2.5 e 2.6 são apresentados os resultados obtidos na caraterização química do efluente bruto filtrado do ensaio final com agitação.

Tabela 2.5 – Caraterização química das águas ruças do ensaio final com agitação contínua.

Parâmetros	Média (µg/L)
Ácido mirístico	33,3 ± 0,4
Ácido palmítico	98,8 ± 0,2
Ácido linoleico	113,3 ± 0,3
Ácido oleico	327,5 ± 0,4
Ácido esteárico	40,6 ± 0,2
Ácido α-linolenico	23,7 ± 0,3
Ácido lignocérico	28,0 ± 0,4
β-sitosterol	40,7 ± 0,2
Catecol	74,5 ± 0,3
Tirosol	81,0 ± 0,4
Ácido vanílico	24,3 ± 0,2
Ácido p-cumárico	72,1 ± 0,3
Ácido cafeico	85,5 ± 0,4

Os valores médios obtidos para os compostos orgânicos das águas ruças utilizadas no ensaio, são da mesma ordem de grandeza dos valores obtidos nos ensaios preliminares (Tabela 2.1 da secção 3.1).

Tabela 2.6 – Caraterização química das águas ruças do ensaio final com agitação.

Parâmetros / unidades	
pH	6,75
Cor (Pt-Co)	347
CQO ^a (mg/L)	187
Índice fenólico ^a (mg/L)	0,2

^a amostra filtrada e congelada

O valor de pH obtido é ligeiramente superior aos valores encontrados na bibliografia, que se caracterizam normalmente por valores de pH inferiores a 6 (Justino *et al.*, 2012). Os níveis de CQO e índice fenólico deste efluente foram igualmente inferiores aos documentados (Duarte *et al.*, 2012; Justino *et al.*, 2012), supõem-se que isto resulte do

facto dos mesmos terem sido determinados após a filtração do efluente bruto. Os valores de cor descritos na bibliografia foram determinados por método diferente do realizado neste trabalho, não permitindo uma comparação direta (Khoufi *et al.*, 2007; Amaral *et al.*, 2012).

3.3.2 Análise química do efluente tratado

No final das 144h do ensaio com agitação contínua, não se verificaram alterações visíveis no aspeto das águas ruças. No caso das réplicas do tratamento com granulado 1, a cortiça estava seca na parte superior dando a indicação de não ter ocorrido uma mistura eficaz com o efluente, apesar da agitação orbital. Para o granulado 2, essa mistura completa já ocorreu, mas o efluente final manteve aparentemente o mesmo aspeto. Para ambos tratamentos com os dois granulados verificou-se formação de agregados de sólidos que acabaram por depositar no fundo do frasco, possivelmente decorrente da agitação contínua, já que a mesma formação de agregados foi registada nos controlos. A figura 45 e 46 permitem visualizar a formação de agregados no final do tratamento com cortiça para os dois granulados, assim como nos controlos apenas com efluente. No caso dos controlos preparados para cada um dos granulados com água destilada é possível verificar que as réplicas com o granulado 2 possuem menos cor do que nas réplicas com o granulado 1 (figuras 47 e 48). Esta evidência demonstra que o granulado 1 mesmo após o pré-tratamento com lavagens ainda liberta compostos com cor para solução, transmitindo cor à água destilada. Contudo, a análise química efetuada não conseguiu detetar que compostos foram responsáveis pela coloração da água destilada dos controlos, na medida em que os compostos orgânicos detetados nas réplicas do efluente, estiveram sempre abaixo do limite de deteção nestes controlos. Por outro lado é importante salvaguardar, que por questões de equilíbrio osmótico, a libertação de compostos com cor da cortiça, registada quando esta é mergulhada em água destilada, pode não ocorrer quando a mesma é mergulhada num efluente com uma força osmótica superior.

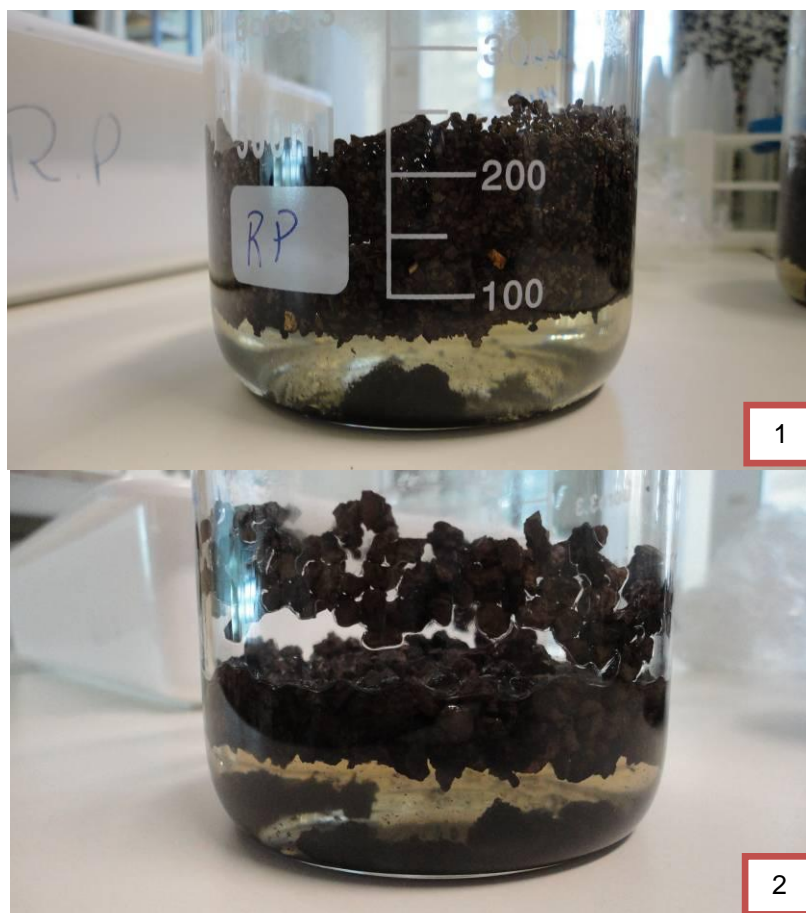


Figura 45. Resultado visual do ensaio com águas ruças e granulado 1 (1) e granulado 2 (2) após agitação contínua durante 144 horas.



Figura 46. Resultado visual do controlo com efluente sem cortiça no ensaio com águas ruças após agitação contínua durante 144 horas.



Figura 47. Resultado visual do controlo com água destilada do ensaio com granulado 1 (a) e granulado 2 (b) após agitação contínua durante 144 horas.

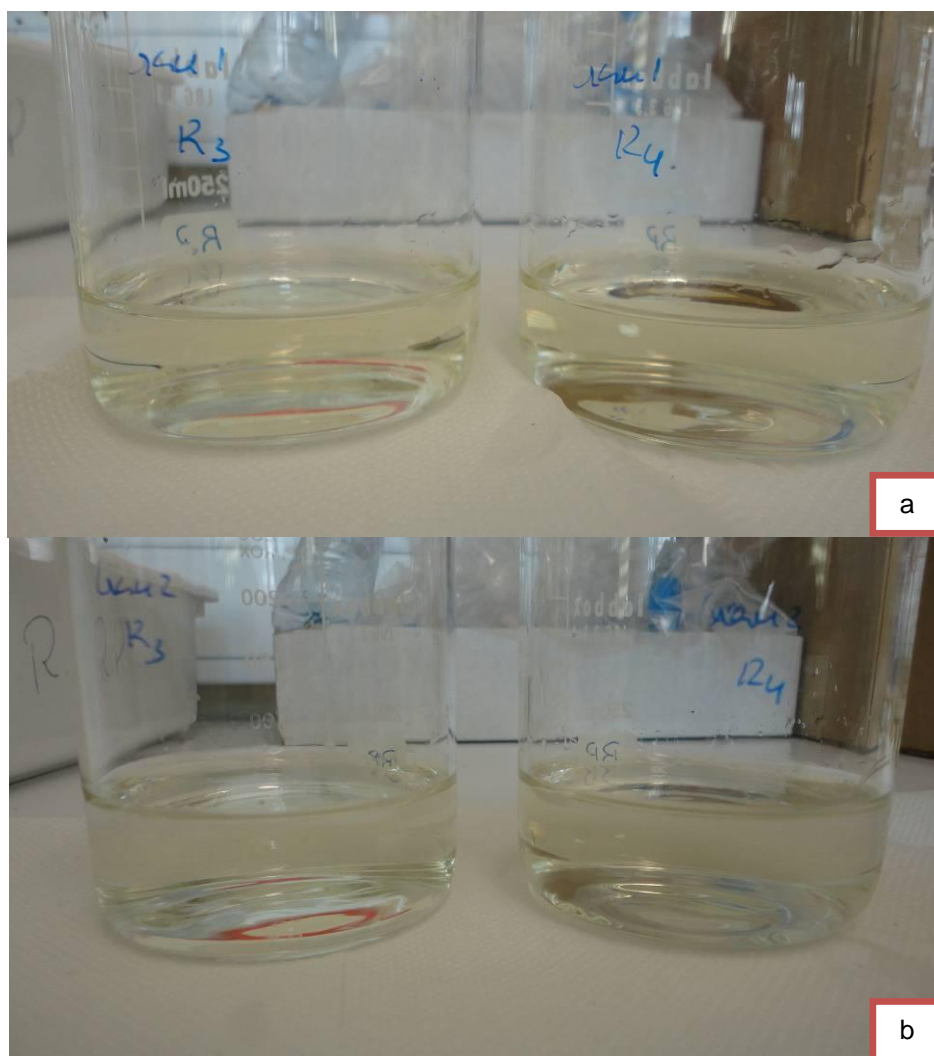


Figura 48. Aspeto do controlo tratado com granulado 1 (a) e granulado 2 (b) após filtração.

Nas tabelas A-II-3,4 e 5 do anexo II são apresentados os resultados obtidos para os diferentes parâmetros no ensaio da cortiça com agitação contínua.

Na tabela 2.7 são apresentados os resultados das análises químicas efetuadas às réplicas dos diferentes tratamentos do ensaio.

Tabela 2.7 – Resultados da caracterização química do ensaio final com agitação contínua: Concentração dos diferentes compostos químicos e respetiva taxa de remoção (T.R.) com os dois granulados.

Parâmetros	CTLGran 1 (µg/L) Média±desvio padrão	CTLGran 2 (µg/L) Média±desvi o padrão	Eflu_Gran 1 (µg/L) Média±desvi o padrão	Eflu_Gran 2 (µg/L) Média±desvi o padrão	CTL_Eflu. (µg/L) Média±desvio padrão
Ácido mirístico	< L. D (0,02)	< L. D	30,5 ± 0,289 T.R.: 8,41%	30,7 ± 0,279 T.R.: 7,81%	33,21 ± 0,243 T.R.: 0,27%
Ácido palmítico	< L. D (0,02)	< L. D	93,725 ± 0,517 T.R.: 5,14%	94,05 ± 0,44 T.R.: 4,81%	98,375 ± 0,499 T.R.: 0,43%
Ácido linoleico	< L. D (0,01)	< L. D	107,1 ± 0,273 T.R.: 5,47%	107,08 ± 0,486 T.R.: 5,49%	113,241 ± 0,429 T.R.: 0,052%
Ácido oleico	< L. D (0,03)	< L. D	316,46 ± 0,363 T.R.: 3,37%	316,45 ± 0,474 T.R.: 3,37%	327,16 ± 0,421 T.R.: 0,10%
Ácido esteárico	< L. D (0,025)	< L. D	35,46 ± 0,906 T.R.: 12,7%	35,56 ± 1,476 T.R.: 12,41%	38,97 ± 1,19 T.R.: 4,01%
Ácido α-linolenico	< L. D (0,02)	< L. D	33,43 ± 7,176 T.R.: -41,05%	37,51 ± 1,32 T.R.: -58,27%	23,28 ± 0,36 T.R.: 1,77%
Ácido lignocérico	< L. D (0,01)	< L. D	24,85 ± 0,483 T.R.: 11,25%	24,675 ± 0,354 T.R.: 11,88%	27,325 ± 0,393 T.R.: 2,41%
β-sitosterol	< L. D (0,03)	< L. D	37,5 ± 0,331 T.R.: 7,86%	37,37 ± 0,387 T.R.: 8,18%	40,46 ± 0,47 T.R.: 0,59%
Catecol	< L. D (0,01)	< L. D	70,475 ± 0,286 T.R.: 5,40%	70,45 ± 0,347 T.R.: 5,44%	74,625 ± 0,339 T.R.: -0,17%
Tirosol	< L. D (0,01)	< L. D	74,3 ± 0,4 T.R.: 8,27%	74,225 ± 0,331 T.R.: 8,36%	80,925 ± 0,393 T.R.: 0,09%
Ácido vanílico	< L. D (0,02)	< L. D	21,792 ± 0,303 T.R.: 10,32%	21,97 ± 0,37 T.R.: 9,59%	24,41 ± 0,368 T.R.: -0,45%
Ácido p-cumarico	< L. D (0,02)	< L. D	67,375 ± 0,286 T.R.: 6,55%	67,275 ± 0,344 T.R.: 6,69%	72,175 ± 0,369 T.R.: -0,10%
Ácido cafeico	< L. D (0,025)	< L. D	79,466 ± 0,333 T.R.: 7,06%	79,45 ± 0,36 T.R.: 7,08%	86,15 ± 0,34 T.R.: -0,76%

< L.D. – inferior ao limite de deteção; T.R. – taxa de remoção

Analisando os resultados obtidos observa-se para a maioria dos parâmetros uma ligeira redução em ambos os tratamentos em relação ao controlo do efluente bruto, resultando desta forma numa ligeira melhoria na qualidade final do efluente após tratamento com os diferentes granulados. Esta redução pode ser melhor constatada pelo cálculo das taxas de remoção para cada parâmetro relativamente ao efluente bruto (Tabela 2.7). Verifica-se que estas variam entre 3,37% e 12,7%, sendo os valores de remoção superiores maioritariamente no granulado 2, embora a diferença para os valores obtidos com o

granulado 1 seja mínima. Exceto para o ácido α -linolenico cuja taxa de remoção foi negativa para ambos os granulados, verifica-se para os restantes parâmetros uma melhoria na qualidade final do efluente. Em relação ao controlo do efluente, as taxas de remoção são mínimas, tal como seria de esperar em relação aos tratamentos com os granulados, e em alguns dos compostos até negativas. Esta remoção não resultou da agregação de sólidos e sua deposição, na medida em que este material foi vigorosamente misturado com efluente, antes do mesmo ser armazenado para análise química. Nos controlos com os granulados em água destilada, e não obstante a cor, nenhum dos compostos presentes no efluente foi registado acima do nível de deteção.

A análise de variância de uma via registou a ocorrência de diferenças significativas entre o CTL de efluente sem cortiça e do efluente tratado com cortiça (granulado 1 e granulado 2) após 144 dias para os seguintes parâmetros: pH (G1: $F=259,7$; d.f. 6, 7; $p<0,01$; G2: $F=324,6$; d.f. 6, 7; $p<0,01$); condutividade (G1: $F=25,12$; d.f. 6, 7; $p=0,002$; G2: $F=38,38$; d.f. 6, 7; $p=0,008$). Por oposição para o parâmetro cor não houve qualquer variação significativa após 144 dias de contacto do efluente com a cortiça (G1: $F=3,44$; d.f. 6, 7; $p=0,113$; G2: $F=3,36$; d.f. 6, 7; $p=0,116$). De facto e como se pode ver pelas figuras 49 e 50, o contacto com a cortiça foi responsável por uma redução significativa do pH do efluente para valores próximos da neutralidade (e mais próximos do seu valor inicial de 6,75). Os valores de pH obtidos neste ensaio foram também muito próximos e semelhantes aos obtidos no ensaio preliminar sem agitação. Pelo que a introdução da variável agitação não provocou nenhuma alteração marcante relativamente a este parâmetro. Neste ensaio este efeito pode ser especificamente atribuído aos dois granulados, na medida em que no CTL apenas com efluente o pH subiu para valores acima de 8.

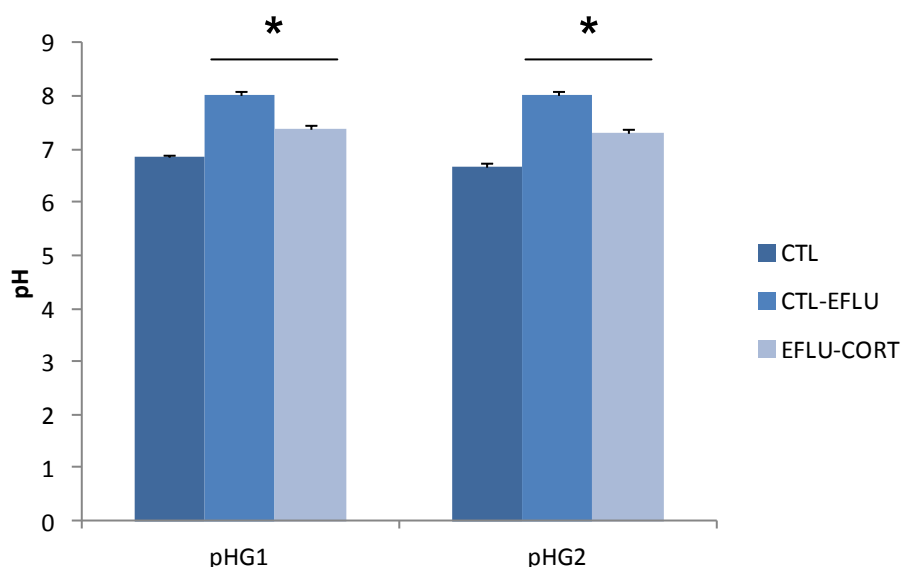


Figura 49. Variação de pH entre tratamentos no final dos 144 dias de ensaio. As barras de erro representam o desvio padrão, e o asterisco as diferenças significativas entre o CTL de efluente sem cortiça e o efluente tratado com cortiça.

A condutividade apresentou uma tendência semelhante ao pH tendo diminuído significativamente no efluente tratado com cortiça (figura 50). A variação dos dois fatores analisada em simultâneo sugere captação de grupos hidroxilo por parte da cortiça, causando em simultâneo um menor aumento de pH, do que ocorre no efluente sem cortiça, e uma menor condutividade. A variação de condutividade terá estado deste modo sobretudo relacionada com estes iões, o que justifica que a redução de cor não tenha sido significativa. Não obstante este facto, e apesar de os dois granulados se terem comportado do mesmo modo, o G1 foi responsável por conferir mais cor à água destilada ($207,3 \pm 48,84$ unidades Pt-Co) do que o granulado 2 ($84,0 \pm 6,0$ unidades Pt-Co).

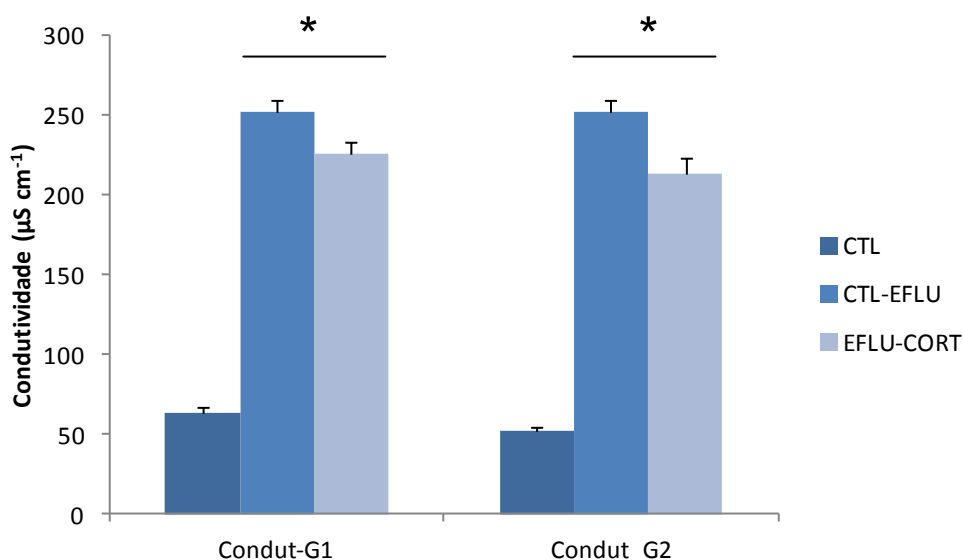


Figura 50. Variação de condutividade entre tratamentos no final dos 144 dias de ensaio. As barras de erro representam o desvio padrão, e o asterisco as diferenças significativas entre o CTL de efluente sem cortiça e o efluente tratado com cortiça.

No que refere à CQO e ao índice fenólico, embora não tenha sido possível efetuar a análise de variância de uma via, devido ao facto de se ter analisado apenas uma amostra composta pelas quatro réplicas, é possível observar que o granulado 2, foi responsável por um aumento significativo destes dois parâmetros no efluente, ao contrário do que seria de esperar com base na cor. Este fato poderá ser explicado pelo tamanho superior das partículas do granulado 2, pois a cortiça poderá apenas disponibilizar a sua superfície externa nos processos de adsorção e desta forma a capacidade de adsorção da cortiça aumenta com a diminuição do tamanho do granulado (Domingues *et al.*, 2005). Por outro lado a cortiça é constituída por diversos grupos funcionais que estão envolvidos em diferentes tipos de reações que podem competir com diversos tipos de iões presentes no efluente pelos centros ativos de biosorção. É possível ocorrer a saturação desses locais, dificultando os processos de adsorção (Psareva *et al.*, 2005).

Tabela 2.8 – Resultados obtidos para CQO e índice fenólico no ensaio final com agitação contínua.

	CQO (mg/L)	Índice Fenólico (mg/L)
CTL G1	55	0,2
CTL G2	59	< 0,2
CTL Efluente	187	0,2
Efluente_G1	193	0,3
Efluente_G2	288	3

A determinação do volume dos granulados, no final das 144h permitiu verificar que comparado o controlo de granulado em água destilada *versus* o mesmo granulado exposto ao efluente houve um aumento significativo para o granulado 2 ($F=9,175$; d.f. 6,7; $p=0,023$) ao contrário do que se registou para o granulado 1 ($F=2,5$; d.f. 6,7; $p=0,164$). Não obstante, comparando o volume dos dois granulados no início e no final do ensaio, verifica-se que o granulado 1 teve mais capacidade de absorção de água, na medida em que comparativamente ao volume inicial adicionado ao ensaio, foi aquele que registou um aumento superior. Perante estes resultados e sendo a cortiça hidrofóbica, o granulado 1 terá da mesma forma uma maior capacidade para adsorver outros compostos, nomeadamente orgânicos, em comparação ao granulado 2, comprovando-se pelos melhores resultados obtidos para os parâmetros CQO e índice fenólico.

4. Conclusões

Os resultados dos ensaios preliminares efetuados com cortiça e sem agitação mostraram que não foi promovido o contato efetivo das águas ruças com toda a área superficial da cortiça e permitiram concluir que não obstante o tratamento a que foram sujeitos, os diferentes granulados ainda libertaram para o meio aquoso uma quantidade significativa de resíduo sólido fino, independentemente do tempo de exposição. Isto levou a concluir sobre a importância de efetuar um tratamento preliminar dos granulados. Os resultados obtidos para os parâmetros químicos (pH e cor), demonstraram que o equilíbrio de bioissorção de poluentes orgânicos na cortiça é atingido em 20-48 horas tal como referenciado por outros autores (Domingues, 2005; Domingues *et al.*, 2005; Villaescusa *et al.*, 2011). Contudo, devido ao facto de não se terem observado resultados aparentes em termos de cor do efluente, e pelo facto de as análises químicas não terem sido efetuadas de imediato, tomou-se a decisão de prolongar a exposição do efluente à cortiça, para 144h.

No ensaio final, a introdução da variável agitação orbital, não provocou grandes alterações nos resultados obtidos, nomeadamente no que refere ao pH, cor e condutividade em relação ao ensaio preliminar sem agitação. Sendo a cortiça, um material de baixa densidade, a agitação orbital não impediu que o granulado, se mantivesse sempre à superfície, pelo que não se conseguiram melhorias significativas no contacto da cortiça com o efluente. É possível que o enchimento de uma coluna com o granulado, através da qual o efluente será forçado a passar e a permanecer sobre pressão, possa ser mais eficaz no contacto superficial do mesmo com a cortiça e na subsequente adsorção dos compostos. Os resultados obtidos para o volume dos dois granulados confirmam a hidrofobicidade da cortiça. Porém a sua utilização neste efluente permitiu obter uma redução, ainda que reduzida, mas indiferenciada de diversos compostos orgânicos que fazem parte da sua constituição. Contudo, é certo que o tempo de exposição (144h) pode de facto ter sido excessivo, e compostos que inicialmente estariam adsorvidos à superfície do granulado, terão entrado de novo em solução. Tal facto leva-nos a crer que com estudos adicionais onde se testem novas formas de aumentar o contacto da cortiça com o efluente, e em que se volte a reduzir esse tempo de contacto, podem aumentar a eficácia do papel adsorvente da cortiça.

Face aos resultados obtidos o granulado 1 será uma melhor opção como adsorvente para ensaios de bioissorção, muito embora continue a libertar resíduos com cor após lavagem. Apesar dos resultados obtidos para o parâmetro cor demonstrem que o granulado 1 confere mais cor à água destilada do que o granulado 2, os valores de CQO e índice

fenólico obtidos no ensaio de 144 horas são inferiores no granulado 1. Associado ao fato de o tempo de exposição ter sido excessivo, melhorando as condições do ensaio e reduzindo os tempos de exposição, espera-se ainda uma melhoria nos resultados agora obtidos.

5. Referências Bibliográficas

- Barberis A., Dettori S., Filigheddu M.R., 2003. Management problems in Mediterranean cork oak forests: post-fire recovery. *Journal of Arid Environments* 54 (3): 565 e 569.
- Bento M.F., Pereira H., Cunha M.A´., Moutinho A.M.C., Berg K.J.v.d., Boon J.J., Brink O.v.d., Heeren R.M.A., 2001. Fragmentation of suberin and composition of aliphatic Monomers Released by Methanolysis of cork from *quercus suber* L., analysed by GC-MS, SEC and MALDI-MS. *Holzforschung* 55 (5): 487 e 493.
- Fu F., Wang Q., 2011. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *Journal of Environmental Management* 92: 407 - 418.
- Farooq U., Kozinski J. A., Khan M. A., ATHAR M., 2010. Biosorption of heavy metal ions using wheat based biosorbents - A review of the recent literature. *Bioresource Technology* 101: 5043 - 5053.
- Fiol N., Villaescusa I., Martí´nez M., Miralles N., Poch J., Serarols J., 2003. Biosorption of Cr(VI) using low cost sorbents. *Environmental Chemistry Letters* 1 (2): 135e139.
- Kapoor T., Viraraghavan Bioresour., 1998. *Technol.* 63: 109.
- Vasconcelos L.A.T., González-Beça C.G., 1997. *Eur. Water Pollut. Control* 7 (1): 47.
- Chubar N., Carvalho J.R., Correia M.J.N., 2004. Heavy metals biosorption on cork biomass: effect of the pre-treatment. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 238 (1e3): 51 e 58.
- Pintor A. M. A., Ferreira C. I. A., Pereira J. C., Correia P., Silva S. P., Vilar V. J P., Botelho C. M S., Boaventura R., 2012. Use Of cork powder and granules for the adsorption of pollutants: A review. *Water Resea.* 46: 3152 – 3166.
- Silva S.P., Sabino M.A., Fernandes E.M., Correlo V.M., Boesel L.F., Reis R.L., 2005. Cork: properties, capabilities and applications. *International Materials Reviews* 50 (6): 345 e 365.
- Cardoso B., Mestre A.S., Carvalho A.P., Pires J., 2008. Activated carbon derived from cork powder waste by KOH activation: preparation, characterization, and VOCs adsorption. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 47 (16): 5841 e 5846.
- Conde E., Cadahí’a E., Garcia-Vallejo M.C., Gonzalez- Adrados J.R., 1998. Chemical characterization of reproduction cork from Spanish *quercus suber*. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 18 (4): 447 e 469.
- Corticeira Amorim, S.G.P.S., 2009. CORKSORB – Sustainable Absorbents.
- Corticeira Amorim, S.G.P.S., 2011. In: Corticeira Amorim, S.G.P.S. (Ed.), *Annual report and accounts 2010*.
- Domingues V., 2005. Utilização de um produto natural (cortiça) como adsorvente de pesticidas piretróides em águas. Tese de Doutoramento, Faculty of Engineering - University of Porto, Porto.

Domingues V., Alves A., Cabral M., Delerue-Matos C., 2005. Sorption behaviour of bifenthrin on cork. *Journal of Chromatography A* 1069 (1): 127 e 132.

Domingues V.F., Priolo G., Alves A.C., Cabral M.F., Delerue- Matos C., 2007. Adsorption behavior of alpha -cypermethrin on cork and activated carbon. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* 42 (6): 649 e 654.

Duarte K.R., Freitas A.C., Pereira R., Pinheiro J.C., Gonçalves F., Azaari H., Azzouzi M.E., Zrineh A., Zaydoun S., Duarte A.C., Rocha-Santos T.A.P., 2012. Treatment of Olive Oil Mill Wastewater by Silica-Alginate-Fungi Biocomposites. *Water Air Soil Pollut.* 223: 4307 – 4318.

Fernandes E.M., Correlo V.M., Chagas J.A.M., Mano J.F., Reis R.L., 2010. Cork based composites using polyolefin's as matrix: morphology and mechanical performance. *Composites Science and Technology* 70 (16): 2310 e 2318.

Fiol N., Villaescusa I., Martínez M., Miralles N., Poch J., Serarols J., 2003. Biosorption of Cr(VI) using low cost sorbents. *Environmental Chemistry Letters* 1 (2): 135 e 139.

Gil L., 1997. Cork powder waste: an overview. *Biomass & Bioenergy* 13 (1e2): 59 e 61.

Justino C.I., Duarte K., Loureiro F., Pereira R., Antunes S.C., Marques S.M., Gonçalves F., Rocha-Santos T.A.P., Freitas A.C., 2009. Toxicity and organic content characterization of olive oil mill wastewater undergoing a sequential treatment with fungi and photo-Fenton oxidation. *J Hazard Mat* 172: 1560 – 1572.

Karbowiak T., Mansfield A.K., Barrera-García V.D., Chassagne D., 2010. Sorption and diffusion properties of volatile phenols into cork. *Food Chemistry* 122 (4): 1089 e 1094.

Kwon S.H., Cho D., 2009. A comparative, kinetic study on cork and activated carbon biofilters for VOC degradation. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 15 (1): 129 e 135.

Mestre A.S., Pires J., Nogueira J.M.F., Carvalho A.P., 2007. Activated carbons for the adsorption of ibuprofen. *Carbon* 45 (10): 1979 e 1988.

Miller J. N., Miller J. C., 2005. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry* (5th ed.). New York: Prentice Hall.

Mota D., Marques P., Pereira C., Gil L., Rosa M.F., 2006. Lead Bioremoval by Cork Residues as Biosorbent. *Fernando Pessoa University, Porto, Portugal*, pp. 251 e 264.

Mourão P.A.M., Carrott P.J.M., Ribeiro Carrott M.M.L., 2006. Application of different equations to adsorption isotherms of phenolic compounds on activated carbons prepared from cork. *Carbon* 44 (12): 2422 e 2429.

O'Dell J.W., 1993. Method 410.4, Revisão 2: The Determination of Chemical Oxygen Demand by Semi-Automated Colorimetry. *Environmental Monitoring Systems Laboratory Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio* 45268.

Olivella M.A., Jove P., Oliveras, A., 2011a. The use of cork waste as a biosorbent for persistent organic pollutants study of adsorption/desorption of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 46 (8): 824 e 832.

Pereira H., 1988. Chemical composition and variability of cork from *Quercus suber* L. *Wood Science and Technology* 22 (3): 211 e 218.

Psareva T.S., Zakutevskyy O.I., Chubar N.I., Strelko V.V., Shaposhnikova T.O., Carvalho J.R., Correia M.J.N.C., 2005. Uranium sorption on cork biomass. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 252: 231 – 236.

Villaescusa I., Fiol N., Cristiani F., Floris C., Lai S., Nurchi V.M., 2002. Copper(II) and nickel(II) uptake from aqueous solutions by cork wastes: a NMR and potentiometric study. *Polyhedron* 21 (14e15): 1363 e 1367.

Villaescusa I., Fiol N., Poch J., Bianchi A., Bazzicalupi C., 2011. Mechanism of paracetamol removal by vegetable wastes: the contribution of [p]e[p] interactions, hydrogen bonding and hydrophobic effect. *Desalination* 270 (1e3): 135 e 142.

http://2.bp.blogspot.com/_lqnfljCYf0/S9HJ3BSKGZI/AAAAAAAAABc/X5A06ZuyMsM/s1600/sobreiro%5B1%5D.jpg, acesso no dia 21 de setembro de 2013

CONCLUSÃO FINAL

Após análise dos resultados obtidos confirmamos que as águas ruças continuam a constituir uma externalidade preocupante, de uma atividade económica de grande importância para os países do Mediterrâneo, que é a produção de azeite. Os resultados da caracterização química do efluente bruto testado neste ensaio, demonstraram a variabilidade da sua composição química, comparativamente ao mesmo efluente proveniente de outras regiões geográficas, o que como se sabe está dependente de diversos fatores desde o cultivo da oliveira ao processo produtivo do azeite. Os valores determinados neste trabalho para os parâmetros CQO, cor e índice fenólico, estão como seria de esperar acima do recomendado para a descarga de águas residuais segundo o Decreto de Lei nº 236/98 de 1 de agosto de 1998.

Quanto ao ensaio de fitorremediação com *L. minor*, verificou-se que a espécie foi tolerante às águas ruças, pois conseguiu adaptar-se às características físico-químicas das águas ruças aumentando a sua biomassa, pelo menos até um período de 21 dias de exposição. No entanto, muito embora tenha havido crescimento de *L. minor* nas águas ruças, a clorose verificada de forma generalizada em ambos os ensaios, comprova a resposta da espécie à elevada toxicidade destas águas residuais, já reportada para outras espécies (Khellaf e Zerdaoui, 2010).

Contudo, e uma vez que a performance da planta não foi afetada sobretudo nos primeiros sete dias de exposição, testou-se a renovação da biomassa exposta ao efluente, a cada sete dias, na melhoria da qualidade físico-química do efluente. Esta estratégia foi responsável por uma melhoria ainda que muito ténue revelada pelos parâmetros CQO e índice fenólico. Não ficou claro, com o estudo efetuado se a remoção de compostos orgânicos do efluente, ocorre por absorção, por adsorção às raízes ou por ambos os processos. Os resultados obtidos não deixaram contudo de ser promissores, sugerindo que se teste um tempo de exposição mais prolongado, reduzindo a altura da coluna do efluente, e aumentando a sua área superficial, de modo a favorecer um maior contacto da planta com o efluente. Contudo a diluição do efluente bruto apenas aumenta a complexidade associada ao tratamento do efluente nas condições reais, e tem ainda a grande desvantagem de exigir um elevado consumo de água. Estes estudos deverão igualmente ser acompanhados por ensaios de toxicidade, para verificar se ocorre alguma redução na toxicidade do efluente. Este trabalho sugere ainda que se testem outras macrófitas aquáticas, para futuras aplicações na fitorremediação deste efluente, na medida em que, ainda que sendo necessário a renovação de biomassa, a mesma pode ser facilmente enviada para incineração, ou para fertilização de solos. Estudos adicionais de fitorremediação serão necessários para este efluente, pois os existentes são

escassos, e como se sabe não existe uma solução de tratamento eficaz para tratamento destas águas residuais de elevada toxicidade.

A utilização da cortiça granulada para remoção de poluentes em solução está documentada, mas a sua utilização a larga escala ainda necessita de estudos adicionais. Muito embora possa ser utilizada de forma promissora em tecnologia de adsorção, não se comprovou a sua eficácia no método adotado para melhorar as características físico-químicas das águas ruças. Os ensaios de bioissorção realizados com a cortiça para o tratamento das águas ruças permitiram obter resultados muito preliminares mas que não são de todo insuficientes, pois foi a primeira vez que se testaram e as condições e variáveis usadas podem ser melhoradas de modo a promover um melhor contato do efluente com o adsorvente. A otimização do tempo de exposição assim como o método de contato, por exemplo por enchimento em coluna, tal como testado para outros adsorventes poderá contribuir para uma melhoria no método a utilizar de modo aperfeiçoar a técnica de adsorção.

ANEXO I

Tabela A.1 – Resultados do ensaio de viabilidade de 7 dias para os parâmetros: pH, nº frondes, nº colónias, peso fresco e seco, cor, CQO e índice fenólico

	Controlo R1	Controlo R2	Controlo R3	E. B. 25% - R1	E. B. 25% - R2	E. B. 25% - R3	E. B. 50% - R1	E. B. 50% - R2	E. B. 50% - R3	E. B. 75% - R1	E. B. 75% - R2	E. B. 75% - R3	E. B. 100% - R1	E. B. 100% - R2	E. B. 100% - R3
pH fim	7,89	7,64	7,56	7,94	8,22	8,23	7,99	7,91	8,17	8,09	8,31	7,99	8,27	8,24	8,36
Nº frondes	132	135	147	232	226	264	276	207	225	197	189	201	186	203	164
Nº colónias	37	34	38	115	117	88	77	69	68	60	55	63	53	60	41
Peso fresco (mg)	42	50,9	68	86,7	55,8	96,8	118,4	88,1	86,8	63,2	79,2	74,1	94,8	86,1	84,2
Peso seco (mg)	6	6,9	6,2	5,5	5	9,4	8,5	5,3	5,1	5,9	5,1	5,3	5,9	6,9	5,4
Cor (Pt-Co)	17	5	32	434	616	656	1100	1616	1648	1600	1976	2200	2707	2420	3053
CQO (mg/L)	26	29		182	186		334	315		450	454		656	672	
Índice fenólico (mg/L)	n.d.			1,6			2,8			3,2			5,4		

n.d.-não determinado

Tabela A.2. – Resultados do ensaio de viabilidade de 14 dias para os parâmetros: pH, nº frondes, nº colónias, peso fresco e seco, cor, CQO e índice fenólico

	Controlo R1	Controlo R2	Controlo R3	E. B. 25% - R1	E. B. 25% - R2	E. B. 25% - R3	E. B. 50% - R1	E. B. 50% - R2	E. B. 50% - R3	E. B. 75% - R1	E. B. 75% - R2	E. B. 75% - R3	E. B. 100% - R1	E. B. 100% - R2	E. B. 100% - R3
pH fim	7,25	7,53	7,46	7,85	7,8	7,79	8,1	8,05	8,21	8,19	8,24	8,34	8,3	8,3	10,33
Nº frondes	132	124	145	223	276	176	333	264	239	242	283	232	259	214	252
Nº colónias	52	51	52	107	93	91	106	72	78	78	85	65	52	51	52
Peso fresco (g)	0,033	0,028	0,033	0,149	0,093	0,055	0,154	0,153	0,15	0,131	0,113	0,136	0,126	0,123	0,063
Peso seco (mg)	4,5	3,2	4,7	4,4	9,5	4,1	11,6	8,3	9,9	11,3	8,1	7,9	11,5	9,9	4,2
Cor (Pt-Co)	20	34	33	343	358	307	336	254	528	924	1016	720	2740	2720	2427
CQO (mg/L)	34	77		149	234		290	373		451	554		656	688	
Índice fenólico (mg/L)	< 0,2	n.d.	n.d.	0,5	n.d.	n.d.	< 0,2	n.d.	n.d.	0,2	n.d.	n.d.	3,2	n.d.	n.d.

n.d.-não determinado

Tabela A.3. – Resultados do ensaio de viabilidade de 21 dias para os parâmetros: pH, nº frondes, nº colónias, peso fresco e seco, cor, CQO e índice fenólico

	Controlo R1	Controlo R2	Controlo R3	E. B. 25% - R1	E. B. 25% - R2	E. B. 25% - R3	E. B. 50% - R1	E. B. 50% - R2	E. B. 50% - R3	E. B. 75% - R1	E. B. 75% - R2	E. B. 75% - R3	E. B. 100% - R1	E. B. 100% - R2	E. B. 100% - R3
pH fim	7,36	7,38	7,43	7,29	7,35	7,38	7,85	7,9	7,87	8,17	8,12	8,18	8,29	8,27	8,25
Nº frondes	116	126	134	423	374	394	383	396	375	280	263	290	236	265	249
Nº colónias	42	39	44	135	36	140	131	134	133	85	94	100	76	93	79
Peso fresco (g)	0,054	0,063	0,061	0,247	0,197	0,268	0,253	0,227	0,237	0,189	0,164	0,195	0,13	0,183	0,152
Peso seco (mg)	10,7	10,4	10,7	34	28,3	29	30,9	25,2	24,3	17,4	17,7	20,5	15,5	16,5	15,3
Cor (Pt-Co)	48	36	37	383	415	444	876	912	1088	1612	1456	1384	2780	2973	2913
CQO (mg/L)	47	48		378	348		408	311		496	508		616	734	
Índice fenólico (mg/L)	n.d.			2,2			2,8			3,5			5,4		

n.d.- não determinado

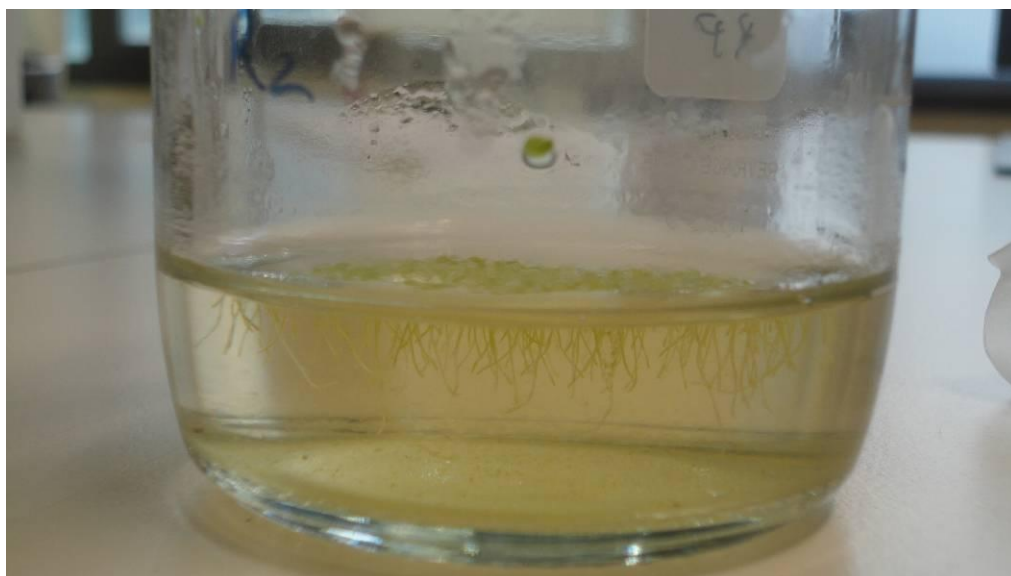


Figura 51 – Foto do ensaio de viabilidade de 14 dias para concentração de 25% de efluente bruto

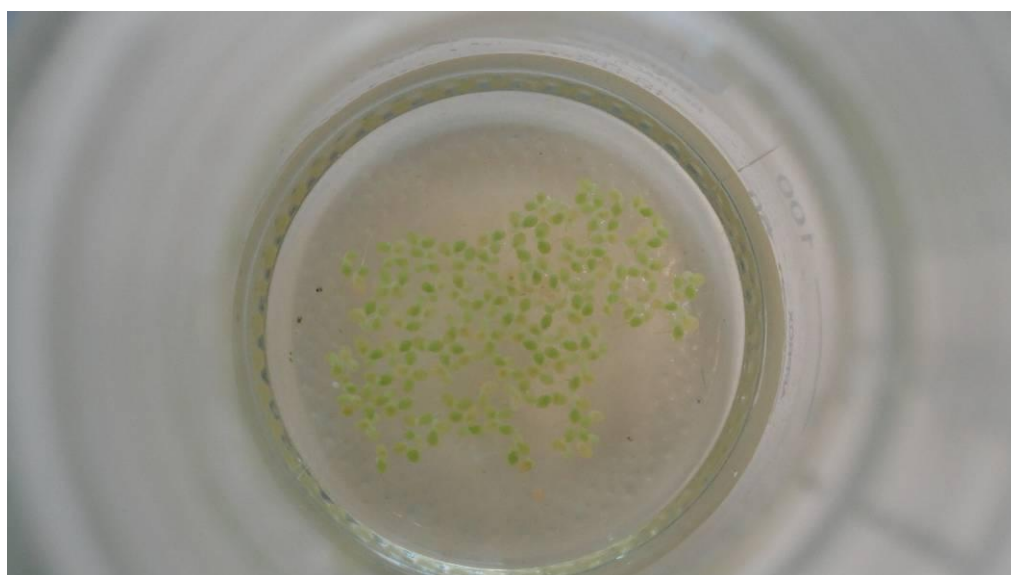


Figura 52 – Foto do ensaio de viabilidade de 14 dias para concentração de 25% de efluente bruto

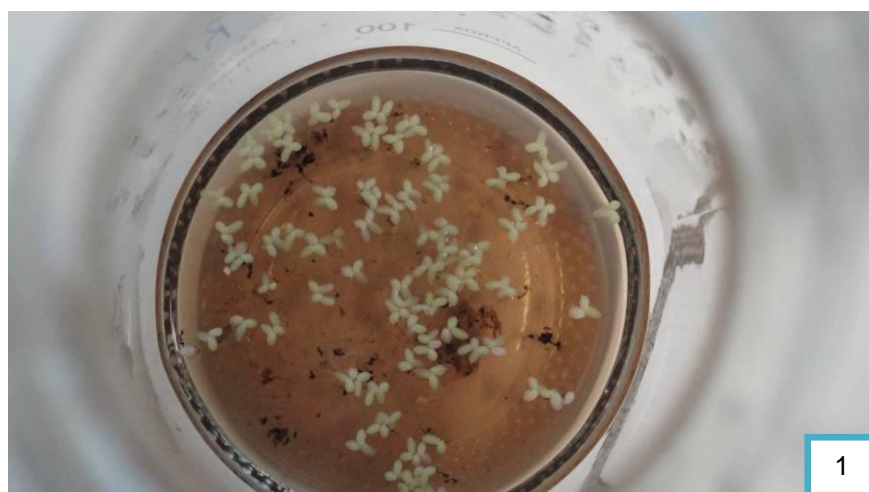


Figura 53 – Fotos das réplicas R1 (1) e R3 (2) do ensaio de viabilidade de 14 dias com concentração de 100% de E.B.

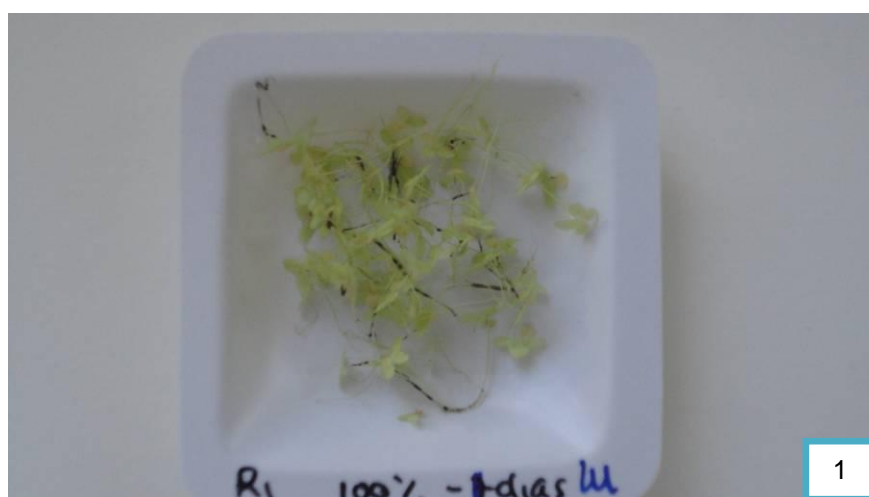




Figura 54 – Foto 1e 2 de *L. minor* no ensaio de viabilidade de 14 dias com concentração de 100% de E.B para as réplicas R1 e R3 respetivamente

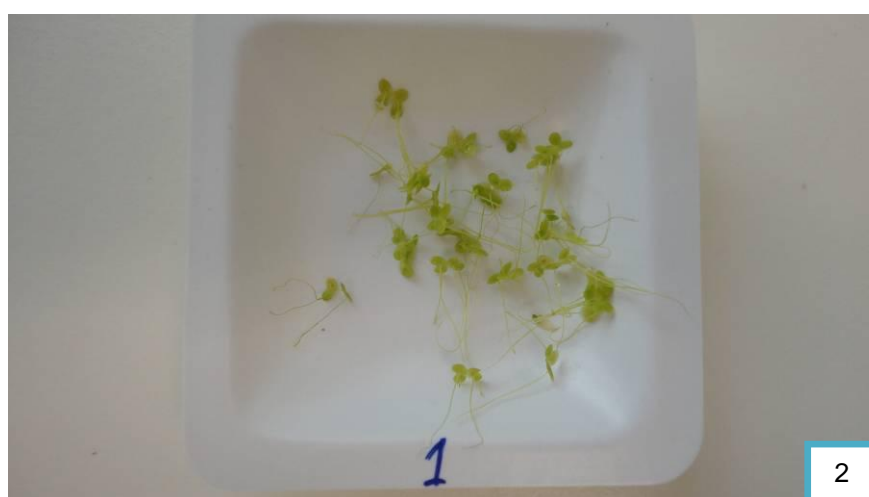


Figura 55 – Fotos 1 e 2 de *L. minor* no controlo do ensaio de 21 dias



Figura 56 – Aspeto de *L. minor* no ensaio de 21 dias com 50% de E.B.

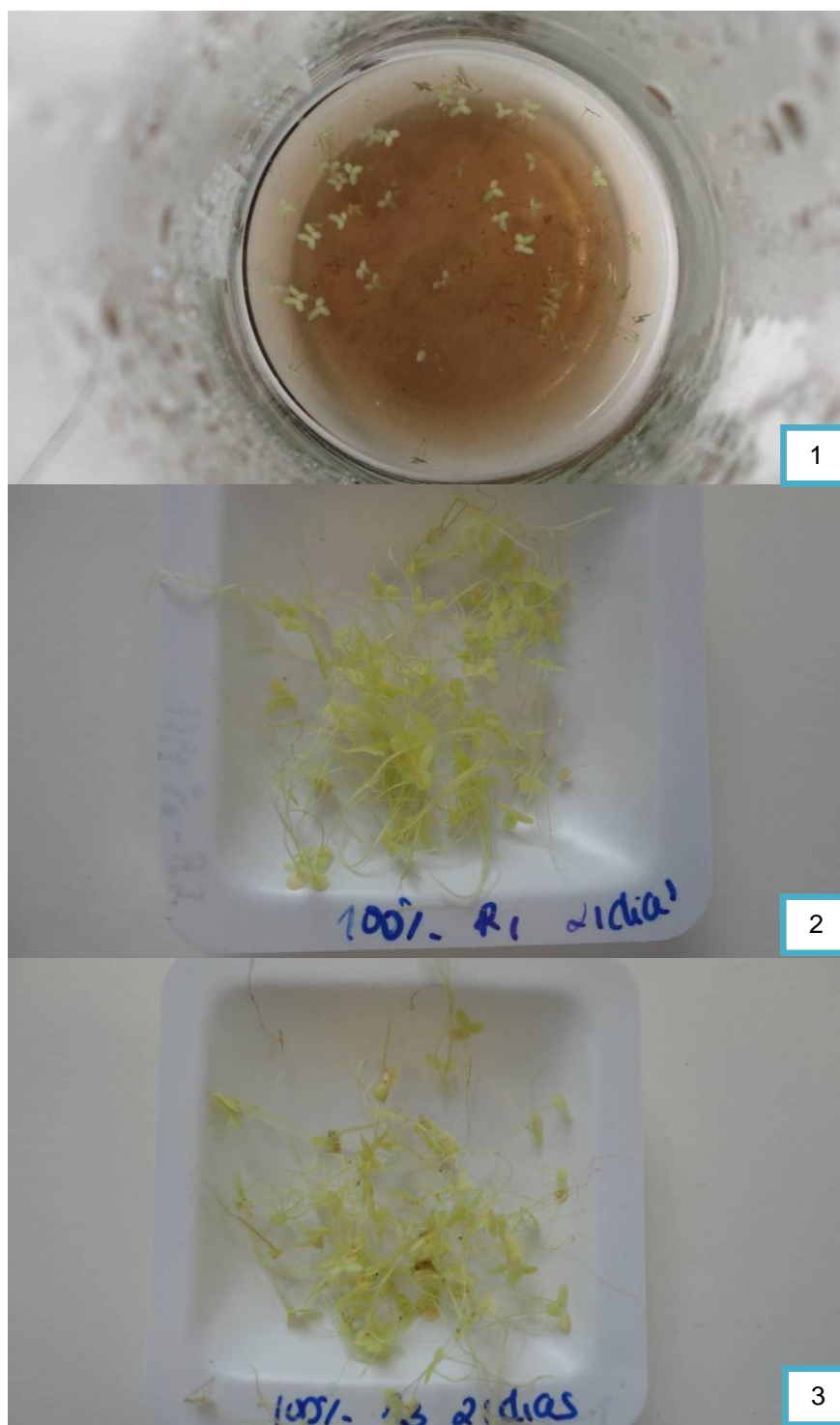


Figura 57 – Fotos 1 da réplica 3, foto 2 e 3 de *L. minor* no ensaio de 21 dias com 100% de E.B.

Tabela A.4 – Média dos resultados do ensaio de longa duração com *L. minor* sem correção de pH.

	Controlo	100% E.B. sem renovação biomassa	100% E.B. com renovação de biomassa
pH 7d	7,47	7,46	7,45
Peso seco 7d (mg)	-	3,33	3
Peso fresco inicial 14d (mg)	-	30	31
Peso seco 14d (mg)	-	-	9,10
Peso fresco inicial 21d (mg)	-	-	29
Peso seco 21d (mg)			7,8
Peso fresco inicial 28d (mg)	-	-	32,6
Peso seco 28d (mg)			7,4
pH 35d	7,87	7,86	7,87
Peso fresco inicial 35d (mg)	-	-	25,8
Peso seco 35d (mg)		15,13	4,43
Cor 35d (Pt-Co)	-	5220	-
CQO 35d (mg/L)	-	974	-
Índice fenólico 35d (mg/L)		4	
pH 49d	-	-	8,03
pH 67d (fim ensaio)	8	-	5,06
Cor 67d (Pt-Co)	4853	-	3600
CQO 67d (mg/L)	688	-	1172
Índice fenólico 67d (mg/L)	3,7	-	2,8

Tabela A.5 – Média dos resultados do ensaio de longa duração com *L. minor* com correção de pH

	Controlo	100% E.B. sem renovação de biomassa	100% E.B. com renovação de biomassa
pH inicial	6,5	7,06	6,37
Peso fresco inicial (mg)	-	28,57	31,7
Peso seco 7d (mg)	-	-	8,7
Peso seco 14d (mg)			8,1
pH 21d			
Peso seco 21d (mg)			7,07
pH 28d	8,64	8,63	8,57
Peso seco 28d (mg)	-	13,87	6,6
Cor 28d (Pt-Co)	-	5240	-
CQO 28d (mg/L)		1582	
Índice fenólico 28d (mg/L)		3	
pH 42d	-	-	9,45
pH 60d	8,69	-	8,66
Cor 60d (Pt-Co)	5300	-	6238
CQO 60d (mg/L)	702	-	996
Índice fenólico 60d (mg/L)	2	-	1,6

ANEXO II

Tabela A-II-1 - Resultados do ensaio preliminar com o granulado 1.

	Controlo Granulado 1				Ensaio granulado 1 com águas ruças				Controlo do efluente				Água ruça
Tempos (h)	12	24	48	72	12	24	48	72	12	24	48	72	-
pH ^a	6,78	6,86	7,44	6,99	7,16	6,54	6,42	6,82	7,82	7,69	6,42	7,47	6,18
Condutividade ^a ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	61	76	90	85	527	517	547	537	521	516	519	598	-
Volume granulado ^a (cm^3)	62,56	59,91	63,09	62,03	65,74	64,15	54,07	57,79	-	-	-	-	-
Volume Gran 1 seco (cm^3)	66,8				66,8				-	-	-	-	-
Cor ^a (Pt-Co)	160	230	193	180	2167	1920	1700	3788	2410	3133	4010	2967	2515

^a média das 3 réplicas

Tabela A-II-2- Resultados do ensaio preliminar com o granulado 2.

	Controlo Granulado 2				Ensaio granulado 2 com águas ruças				Controlo do efluente				Água ruça
Tempos (h)	12	24	48	72	12	24	48	72	12	24	48	72	-
pH ^a	6,92	6,93	7,9	7,15	7,25	6,54	6,53	6,96	7,82	7,69	6,42	7,47	6,18
Condutividade ^a ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	56	69	146	53	526	532	541	551	521	516	519	598	-
Volume granulado ^a (cm^3)	61,5	58,32	64,68	60,97	68,92	56,73	60,44	57,79	-	-	-	-	-
Volume Gran 2 seco (cm^3)	60,97				60,97				-	-	-	-	-
Cor ^a (Pt-Co)	192	150	157	203	2637	2317	2397	2773	2410	3133	4010	2967	2515

^a média das 3 réplicas

Tabela A-II-3- Resultados do controlo do ensaio com agitação contínua

	Controlo 1	Controlo 2	Controlo 3	Controlo 4
pH inicial	6,75			
pH final	7,99	8,08	8,06	8,01
Condutividade inicial ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	269			
Condutividade fim ensaio ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	257	241	258	253
Cor inicial (Pt-Co)	347			
Cor fim ensaio (Pt-Co)	371	452	384	373
CQO^a (mg/L)	187			
Índice fenólico^a (mg/L)	0,2			

a – amostra composta das 4 réplicas

Tabela A-II-4- Resultados do ensaio com agitação contínua com o granulado 1

	Controlo Granulado 1				Ensaio granulado 1 com águas ruças			
Réplicas	1	2	3	4	1	2	3	4
pH inicial	6,27				8,04			
pH final	6,93	6,83	6,83	6,84	7,47	7,39	7,34	7,31
Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	66	57	65	64	232	225	230	216
Volume granulado inicial (cm^3)	88,4	84,4	83,6	82,8	98,1	86,1	90	85,2
Volume Gran 1 seco (cm^3)	72,4				72,4			
Cor (Pt-Co)	262	192	168	174	439	415	435	440
CQO^a (mg/L)	55				193			
Índice fenólico^a (mg/L)	0,2				0,3			

a – amostra composta das 4 réplicas

Tabela A-II-5- Resultados do ensaio com agitação contínua com o granulado 2

	Controlo Granulado 2				Ensaio granulado 2 com águas ruças			
Réplicas	1	2	3	4	1	2	3	4
pH inicial	6,27				8,04			
pH final	6,71	6,65	6,71	6,66	7,34	7,3	7,4	7,24
Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	49	52	55	50	224	206	220	205
Volume granulado inicial (cm^3)	78	76,4	74	80,4	85,2	85,2	79,6	82
Volume Gran 2 seco (cm^3)	69,1				69,1			
Cor (Pt-Co)	84	78	90	187	498	440	574	988
CQO ^a (mg/L)	59				288			
Índice fenólico ^a (mg/L)	< 0,2				3			

a – amostra composta das 4 réplicas